

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Bc. Eliška Kohoutová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Inhibitory redukující anthelmintikum flubendazol u vlasovky slezové
(*Haemonchus contortus*)

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Kohoutová**
Osobní číslo: **C21450**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Inhibitory enzymů redukujících anthelmintikum flubendazol u vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*)**
Téma práce anglicky: **Inhibitors of Enzymes Reducing the Anthelmintic Flubendazole in Barber's Pole Worm (*Haemonchus contortus*)**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Přehled anthelmintik, výskyt, využití; metabolismus flubendazolu, přehled redukujících enzymů, (potenciální inhibitory reduktas)

Experimentální část:

Metodika – stanovení aktivity pomocí LC-MS (sledování redukce flubendazolu), příprava vzorků na LC-MS (vysoušení, rozpouštění, filtrace)

Výsledky – analýza dat, zhodnocení efektu inhibitorů, statistická analýza a diskuze

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Science direct; odborné knihy.
Další dle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultanti diplomové práce: **doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**
Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, katedra
biochemických věd
Mgr. Nikola Rychlá
Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, katedra
biochemických věd
Mgr. Martina Navrátilová
Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, katedra
biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Inhibitory redukující anthelmintikum flubendazol u vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2023

Bc. Eliška Kohoutová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Moc ráda bych poděkovala doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D., Mgr. Nikole Rychlé a Mgr. Martině Navrátilové za jejich ochotu, vstřícnost, čas, podporu, poskytnutí cenných odborných rad, a především za pomoc při experimentální i teoretické části této práce. Ráda bych poděkovala celému kolektivu na katedře biochemických věd na Farmaceutické fakultě UK v HK za jejich milý a profesionální přístup. Také bych velmi ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za její trpělivost, vlídnost, čas, odborné vedení a možnost tuto práci uskutečnit. Ráda bych také poděkovala mým nejbližším za podporu a pochopení během celého studia.

ANOTACE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo studium inhibitorů redukce anthelmintika flubendazolu u vlasovky slezové. Práce se zaměřuje na přehled jednotlivých inhibitorů, mechanismus působení flubendazolu a problematiku rezistence parazitů na anthelmintika. V praktické části byly zkoumány vlivy inhibitorů na vznik redukovaného flubendazolu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Flubendazol, inhibitory, Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*), anthelmintika, enzymy, rezistence, léčiva, benzimidazoly

TITLE

Inhibitors of Enzymes Reducing the Anthelmintic Flubendazole in Barber's Pole Worm (*Haemonchus contortus*)

ANNOTATION

The main aim of this thesis was to study the inhibitors of the reduction of flubendazole in the Barber's pole worm. The thesis focuses on the review of individual inhibitors, the mechanism of action of flubendazole and the issue of parasite resistance to anthelmintics. In the practical part, the effects of inhibitors towards flubendazole were investigated.

KEYWORDS

Flubendazole, inhibitors, Barber's pole worm (*Haemonchus contortus*), anthelmintics, enzymes, resistance, drugs, benzimidazoles

OBSAH

SEZNAM TABULEK	10
SEZNAM ILUSTRACÍ	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD	14
CÍLE PRÁCE	15
TEORETICKÁ ČÁST	16
1. Anthelmintika	16
1. 1. Benzimidazolová anthelmintika	16
1. 1. 1. Flubendazol	17
1. 1. 2. Mechanismus a metabolismus flubedazolu	19
1. 2. Imidazothiazoly	22
1. 3. Makrocyclické laktony	22
1. 4. Deriváty aminoacetonitrilu	23
2. Přehled redukujících enzymů	24
2. 1. Přehled potenciálních inhibitorů reduktáz	26
2. 1. 1. Kyselina glycerhetinová	26
2. 1. 2. Naringenin	29
2. 1. 3. Silybin	31
2. 1. 4. Luteolin	33
2. 1. 5. Glyceraldehyd	35
2. 1. 6. Menadion	36
2. 1. 7. Mebendazol	38
3. Vlasovka slezová (<i>Haemonchus contortus</i>)	41
4. Úprava biologického materiálu před chromatografickou analýzou	46
5. Metody vhodné pro měření vzorků	47
5. 1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	47
5. 2. Hmotnostní spektrometrie	48
5. 3. HPLC-MS	51
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	52
6. Použité chemikálie, přístroje, příslušenství	52

6. 1. Chemikálie	52
6. 2. Přístroje	52
6. 3. Další příslušenství	53
7. Přípravy roztoků	54
7. 1. Příprava 0,1 M Na-fosfátového pufru pH 7,4	54
7. 2. Příprava flubendazolu, inhibitorů, NADPH	54
7. 2. 1 Příprava NADPH	54
7. 2. 2. Příprava inhibitorů	55
7. 2. 3. Příprava flubendazolu	56
7. 3. Příprava subcelulárních frakcí cytosolu	56
7. 4. Inhibiční experiment	57
7. 5. Rozpouštění a měření vzorku	58
7. 6. Parametry pro měření vzorků pomocí metody HPLC-MS	59
7. 7. Vyhodnocení dat	60
8. Výsledky	61
8. 1. Vyhodnocení kyseliny glycerhetinové	62
8. 2. Vyhodnocení naringeninu	63
8. 3. Vyhodnocení silybinu	64
8. 4. Vyhodnocení luteolinu	65
8. 5. Vyhodnocení glycerldehydu	66
8. 6. Vyhodnocení menadionu	67
8. 7. Vyhodnocení mebendazolu	68
DISKUSE	69
ZÁVĚR	72
POUŽITÁ LITERATURA	73

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled ezymů AKR	25
Tabulka 2 Vlastnosti kyseliny glycerhetinové	27
Tabulka 3 Vlastnosti naringeninů	30
Tabulka 4 Vlastnosti silybinů	32
Tabulka 5 Vlastnosti luteolinů	34
Tabulka 6 Vlastnosti glycerinaldehydu	36
Tabulka 7 Vlastnosti menadionu.	37
Tabulka 8 Vlastnosti mebendazolu	39
Tabulka 9 Taxonomie vlasovky slezové	41
Tabulka 10 Přehled složek vzorků	58

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1	Struktura flubendazolu.	17
Obrázek 2	Redukce karbonylu.....	19
Obrázek 3	Mechanismus flubendazolu v organismu.....	21
Obrázek 4	Struktura kyseliny glycerhetinová.....	27
Obrázek 5	Struktura naringeninu.....	29
Obrázek 6	Vznik naringeninu.....	31
Obrázek 7	Struktura silybinu.	32
Obrázek 8	Struktura luteolinu.....	34
Obrázek 9	Struktura glyceraldehydu.....	35
Obrázek 10	Struktura menadionu.	37
Obrázek 11	Struktura mebendazolu.....	39
Obrázek 12	Formy mebendazolu.....	40
Obrázek 13	Cyklus vlasovky slezové.....	42
Obrázek 14	Vajíčka vlasovky slezové.....	43
Obrázek 15	Vlasovka slezová.....	44
Obrázek 16	Samec vlasovky slezové.....	44
Obrázek 17	Samice vlasovky slezové.....	44
Obrázek 18	Komponenty HPLC.....	48
Obrázek 19	Trojité kvadrupól u MS.....	50
Obrázek 20	HPLC-MS.....	51
Obrázek 21	Příprava cytosolu.....	57
Obrázek 22	Záznam gradientové eluce.....	59
Obrázek 23	Inhibice FLU kyselinou glycerhetinovou.....	62
Obrázek 24	Inhibice FLU naringeninem.....	63
Obrázek 25	Inhibice FLU silybinem.	64
Obrázek 26	Inhibice FLU luteolinem.....	65
Obrázek 27	Inhibice FLU glyceraldehydem.....	66
Obrázek 28	Inhibice FLU menadionem.....	67
Obrázek 29	Inhibice FLU mebendazolem.....	68

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AGE	produkty pokročilé glykace
AIDS	syndrom získaného imunodeficitu
AKR	aldo-ketoreduktázy
APCI	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	foto ionizace za atmosférického tlaku
ATP	adenosintrifosfát
CBR	karbonyl reduktáza
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI	elektrosprej
FLU	flubendazol
FLU-H	hydrolyzovaný flubendazol
FLU-R	redukovaný flubendazol
G6PD	glukóza-6-fosfát dehydrogenáza
GIT	gastrointestinální trakt
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
ISE	kmen citlivý na anthelmintika
IRE	kmen rezistentní na anthelmintika
L1	první růstová fáze larvy vlasovky slezové
L2	druhá růstová fáze larvy vlasovky slezové
L3	třetí růstová fáze larvy vlasovky slezové
L4	čtvrtá růstová fáze larvy vlasovky slezové
m	hmotnost
M	molekulární hmotnost
MALDI	desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice
ML	makrocyclické laktony

MRM	záznam vybraných reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická rezonance
PDA	detektor fotodiodového pole
PEG	polyethylenglykol
PTFE	polytetrafluorethylen
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDR	dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem
THF	tetrahydrofuran
TOF	analyzátor doby letu
UDP	uridin difosfát
UV	ultrafialové
z	náboj

ÚVOD

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je gastrointestinální hlístice malých přežvýkavců s vysokou mírou rezistence vůči anthelmintikům. *H. contortus* způsobuje významné parazitární onemocnění zvané haemonchóza, které postihuje malé přežvýkavce a šíří se po celém světě, což vede k úhynu hospodářských zvířat a ekonomickým ztrátám. Podávání anthelmintik je jednou z nejpoužívanějších forem léčby tohoto onemocnění, ale existuje pouze omezený počet schválených anthelmintik. Jedním z prokázaných mechanismů rezistence k anthelmintikům u vlasovky slezové je zvýšená deaktivace a eliminace anthelmintik (např. flubendazolu, mebendazolu) redukcí karbonylové skupiny karbonyl-redukujícími enzymy. Karbonyl-redukující enzymy (CBR) katalyzují první fázi biotransformace xenobiotik a podílejí se na metabolismu léčiv. Předchozí analýza metabolismu rovněž prokázala vyšší schopnost rezistentního kmene (IRE) *H. contortus* redukovat flubendazol účinněji než citlivý kmen (ISE). Cílem této práce bylo studovat *in vitro* NADPH-dependentní enzymatické reakce s využitím cytosolických frakcí z homogenátu kmene *H. contortus* ISE a IRE a pozorovat redukcí flubendazolu. Byla zkoumána tvorba redukovaného flubendazolu (FLU-R) v reakci na vybrané inhibitory (mebendazol, kyselina glycerhetinová, naringenin, silybin, luteolin, glyceraldehyd a menadion) a následně detekována pomocí LC-MS. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny testem dvoucestná analýza rozptylu ANOVA. Podávání anthelmintik je jednou z nejrozšířenějších forem léčby tohoto onemocnění, ale existuje pouze omezený počet schválených anthelmintik. Navíc klesající účinnost v důsledku rozvoje rezistence na léky činí léčbu helmintóz velmi obtížnou. Nárůst rezistence je způsoben několika faktory, například nadměrným používáním profylaktických léčiv. Objev nových inhibitorů, které by mohly zvýšit účinek anthelmintik, by mohl v budoucnu pomoci při léčbě helmintóz.

CÍLE PRÁCE

Cíle k teoretické části:

- Sepsat přehled anthelmintik, jejich výskyt a využití.
- Popsat mechanismus působení flubendazolu.
- Sepsat přehled redukujících enzymů a potenciálních inhibitorů reduktáz.

Cíle k experimentální části:

- Příprava vzorků.
- Sledování redukce flubendazolu.
- Stanovení aktivity pomocí LC-MS.
- Stanovení inhibice tvorby redukovaného flubendazolu danými inhibitory při koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$ u ISE a IRE.
- Analýza dat a shrnutí výsledků analýzy.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Anthelmintika

Anthelmintika jsou látky používající se k léčbě infekcí parazitickými hlísticemi, a to jak u lidí, tak u zvířat. Anthelmintika jsou běžně využívána, mají širokospektrální využití, jsou levná a bezpečná [1]. Mezi základní třídy anthelmintik můžeme zařadit benzimidazoly, makrocyclické laktony, tetrahydropyrimidiny, deriváty acetonitrilu, salicylanilidy, organofosfáty a imidazothiazoly. Za anthelmintikum lze považovat i rostlinné extrakty, které jsou dále ve fázi studií s ohledem na jejich antiparazitickou aktivitu [2, 3]. Tyto látky se u zvířat používají jak pro léčbu infekce parazity, tak i preventivně. Preventivní užívání anthelmintik je praktikováno z důvodu zamezení šíření potenciální nákazy, protože infekce parazity má dopady na zdraví zvířat, a z toho mohou vyplynout další, například ekonomické a ekologické dopady. Zároveň ale toto preventivní opatření může přispívat ke zvyšování rezistence parazitů na anthelmintika [4, 5].

Jak přesně anthelmintika fungují a jejich celý mechanismus není zcela u všech látek znám. Ale mezi základní principy patří cílení na iontové kanály, mikrotubuly a ovlivnění bioenergetiky [4, 6].

1. 1. Benzimidazolová anthelmintika

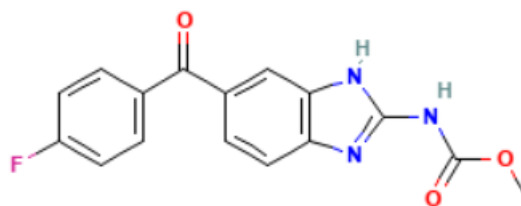
Benzimidazoly patří mezi heterocyclické aromatické sloučeniny jejichž základem je bicykl složený z benzenu a imidazolového heterocyklu [7]. Tyto látky mají amfoterní charakter [8]. Benzimidazolové deriváty jsou předmětem širokého zájmu pro jejich různé biologické aktivity a klinické aplikace, nepoužívají se pouze jako anthelmintika, ale také jako fungicidy, antihistaminika a analgetika [7]. V posledních letech se zkoumá jejich využití v onkologii [9]. Mezi benzimidazolové deriváty lze řadit například inhibitor protonové pumpy (Omeprazol), antihelmintikum (Albendazol, Flubendazol), antidopaminergní léčivo (Domperidon) a antipsychotikum (Pimozide) [7]. Prvním vyrobeným benzimidazolovým anthelmintikem byl thiabendazol v roce 1961 [3].

Benzimidazolová anthelmintika se již dlouho používají pro léčbu helmintóz [10]. Využívají se u zvířat i u lidí po celém světě. Jejich výhodou je nízká cena, vysoká účinnost, nemají vedlejší účinky a mají nízkou toxicitu [11]. Jejich nevýhodou však může být nízká rozpustnost ve vodě, která poté způsobuje snížení biologické dostupnosti a tím terapeutické účinnosti [12]. Hlavním mechanismem účinku benzimidazolových anthelmintik je zabránění

polymerace tubulinů. Vzhledem, k tomu, že je v experimentální práci používán flubendazol, jsou zde uvedeny detailnější informace právě o tomto léčivu, i přesto, že častěji používaným benzimidazolovým anthelmintikem je albendazol, který má podobné účinky [13].

1. 1. 1. Flubendazol

Flubendazol (FLU), dostupný také jako Flumoxan a Fluvermal, je methyl- *N*- [6-(4-fluorbenzoyl)-1*H*- benzimidazol -2-yl]karbamát. Molekulární vzorec FLU je C₁₆H₁₂FN₃O₃ [14]. Toto anthelmintikum bylo vyvinuto v 70. letech 20. století společností Janssen Pharmaceutica [16]. FLU byl schválen v roce 1980 pro léčbu gastrointestinálních infekcí hlísticemi ve veterinární i humánní medicíně [10]. Má typickou benzimidazolovou část, ale důležitým strukturním prvkem je přidáný atom fluoru, čímž se odlišuje od ostatních benzimidazolů. Struktura FLU je znázorněna na Obrázku 1 [17]. FLU má molární hmotnost 313,28 g/mol a jeho bod tání je 244 °C [14, 18]. Struktura FLU je znázorněna na Obrázku 1.



Obrázek 1 Struktura flubendazolu. Převzato a upraveno z [15].

FLU se používá také pro léčbu onchocerciázy a lymfatické filariázy a tyto choroby mohou vést k dermatitidě nebo lymfedému a hydrokélám [10, 19]. Díky své antifungální aktivitě se používá i k léčbě kryptokokózy [20, 21]. FLU je také zkoumán pro své protinádorové účinky u různých typů rakoviny, včetně rakoviny prsu, prostaty, kolorektálního karcinomu, plic a melanomu. Ačkoli byl protinádorový mechanismus FLU studován, nebyl zatím plně pochopen [17, 22]. Výhodou je jeho nízká toxicita [23].

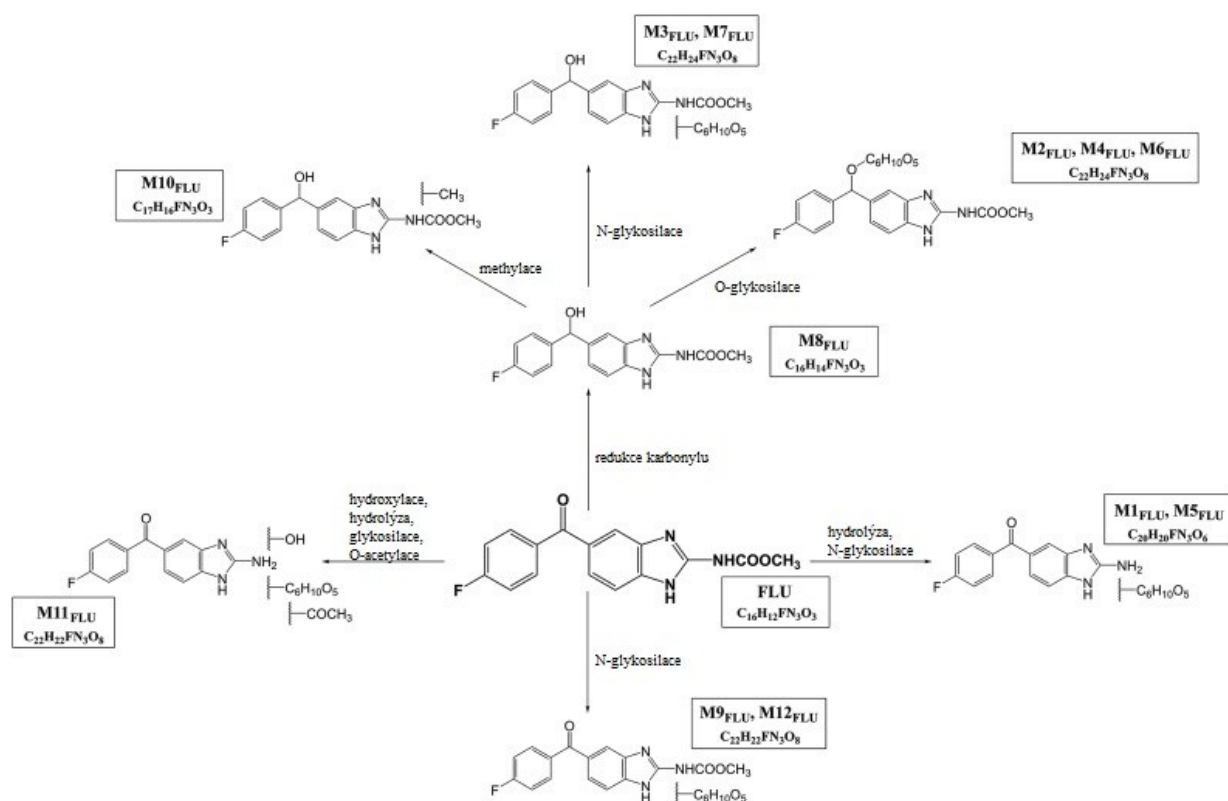
Velice důležitá vlastnost léčiv je jejich rozpustnost ve vodném prostředí. Rozpustnost ovlivňuje účinnost, farmakokinetiku, transport nebo uvolňování léčiva [24]. Flubendazol se vyznačuje špatnou rozpustností ve vodě (cca 1mg/ml, při 25 °C). Špatná rozpustnost může mít za následek nízkou biologickou dostupnost léčiva. Rozpustnost FLU může vylepšit přídavek kyseliny maleinové, což se využívá zatím stále pouze v oblasti výzkumu [25]. Nově se také výzkum zaměřuje na využití interakce FLU s nanočásticemi [18]. Špatná rozpustnost FLU ve vodě ovlivňuje jeho dávkovou formu [24]. V důsledku špatné rozpustnosti ve vodě je zatím léčivo schváleno pouze pro léčbu gastrointestinálních onemocnění hlísticemi u lidí a zvířat. FLU v gastrointestinálním traktu působí lokálně a cíleně a vykazuje vysokou účinnost [18, 20].

FLU se podává perorálně, jedná se zatím o nejúčinnější formu aplikace, vzhledem k jeho omezené vstřebatelnosti a nežádoucím účinkům v případě jiného způsobu aplikace. Subkutánní i intramuskulární podání se ve většině případů spojuje se závažnými reakcemi v místě vpichu jako je zánět a bolest [18, 26, 27]. FLU se vstřebává právě v gastrointestinálním traktu. U lidí, prasat, potkanů, ovcí a psů se při perorálním podání absorbuje pouze malé množství v GIT [28]. Pokud je perorální dávka u lidí 2 g, maximální hladina koncentrace FLU v plazmě dosahuje hodnot nižších než 5 ng/ml. Zvýšení vstřebávání FLU může ovlivnit podání ihned po jídle [29].

Podle nejnovějších výzkumů se účinky FLU zkoumají také v oblasti onkologie. FLU a obecně benzimidazoly mohou zpomalit nebo zablokovat růst metastáz, a to také u nádorů které dosavadně neměly vhodný způsob řešení jejich odstranění. Jedná se například o rakovinu prsu, myelom, kolorektální karcinom, leukémie, melanom, neuroblastom a spinocelulární karcinom. Většina pozitivních účinků FLU na nádor je založena na vlastnosti FLU inhibovat polymeraci tubulinu rakovinových buněk. U různých typů nádorů se tento princip může lišit. Další účinky FLU mohou zahrnovat inhibici aktivátoru transkripce, indukce apoptózy, inhibice kinázy, nebo spouštění ferroptózy. V některých případech však může FLU navzájem interagovat s chemoterapií. V důsledku této interakce jsou poté účinky FLU a chemoterapeutik negativně ovlivněné navzájem a nelze dosáhnout takové účinnosti FLU ani chemoterapeutik. Naopak spojení FLU s kumariny může tyto účinky, vhodné pro léčbu rakoviny, posílit [22, 30, 31, 32].

1. 1. 2. Mechanismus a metabolismus flubedazolu

FLU se podává perorálně, putuje GIT, kde je ho absorbováno pouze velmi malé množství. Největší množství je absorbováno v žaludku a poté ve střevech. V žaludku probíhá velmi rychlá biotransformace, poté následuje i biotransformace v játrech. Roli v biotransformaci flubendazolu však hraje věk, pohlaví a zdravotní stav ovce. Více než 50 % léčiva v původním stavu je však vyloučeno stolicí [33, 34]. Z FLU vzniká redukcí karbonylové skupiny redukovaná forma flubendazolu (FLU-R) a karbamátovou hydrolyzou vzniká z flubendazolu metabolit hydrolyzovaný flubendazol (FLU-H), a to v játrech [13, 33, 35]. Další vzniklé metabolity mohou být například *N*-glykosidy FLU, methylovaný FLU-R nebo *O*-glykosidy FLU-R. Podíl těchto metabolitů se liší na základě pohlaví parazita. FLU koluje krví jako samotný FLU nebo jako metabolity FLU jako jsou například hydrolyzované (FLU-H) nebo redukované metabolity FLU (FLU-R) [36]. Ve většině případů je léčivo vyloučeno z těla do 24 hodin. Co se týká rozdílu mezi kmeny ISE a IRE, IRE kmen vykazuje víc metabolitů FLU než kmen ISE, a to u dospělých parazitů. Redukce karbonylu je přehledně zobrazena na Obrázku 2 [37].



Obrázek 2 Redukce karbonylu. Převzato a upraveno z [37].

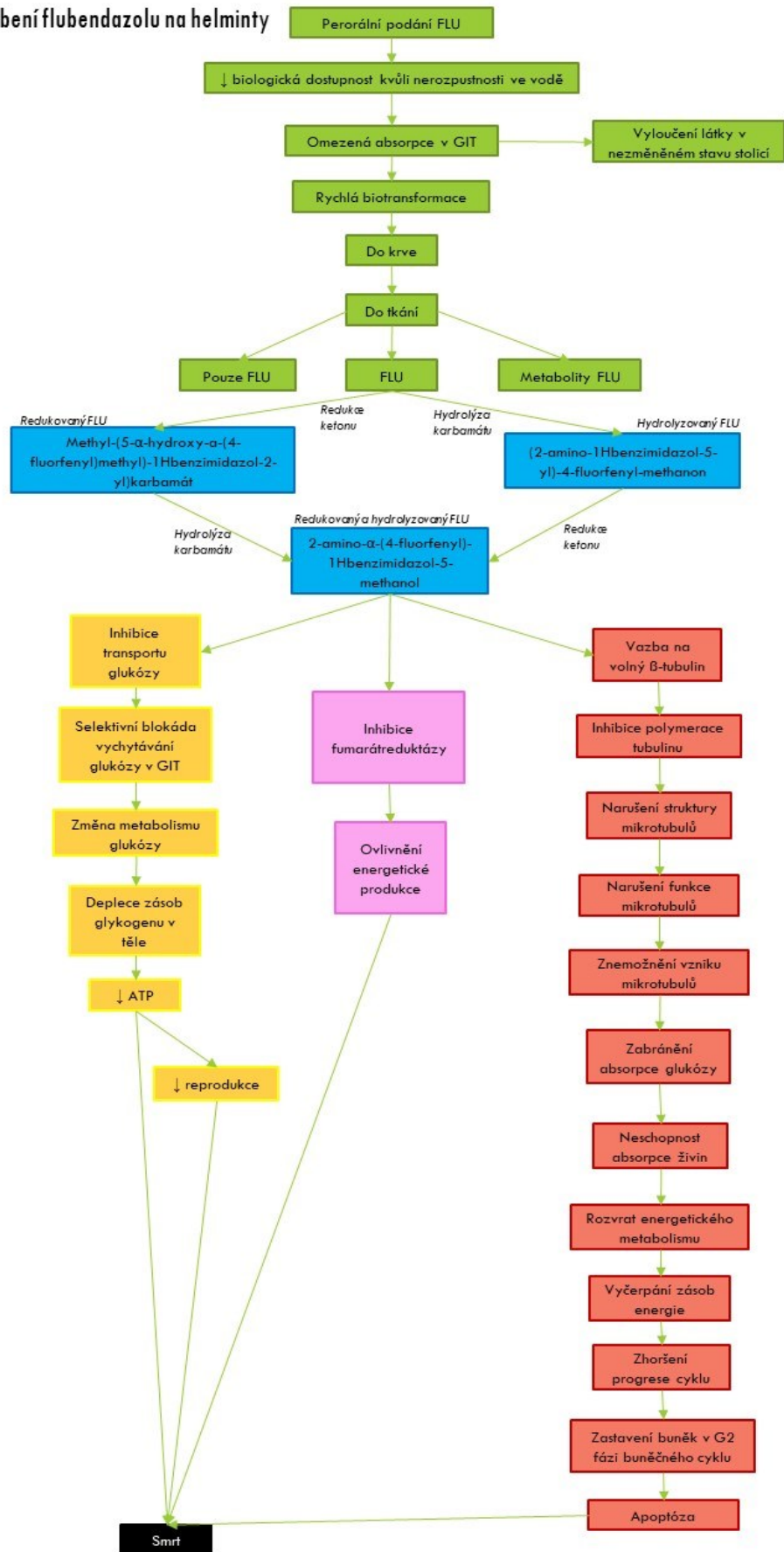
Popsaný mechanismus působení FLU zahrnuje tři možnosti, jak bude FLU působit. Jednou z možností je změnit strukturu mikrotubulů v buňkách parazita [37]. Zjednodušený

popis tohoto principu mechanismu účinku flubendazolu zahrnuje vazbu na tubuliny a následnou inhibici jejich polymerace, které vede k omezení funkce a ke změnám na úrovni struktury mikrotubulů [22, 38]. Čímž také zasahuje do transportu sekrečních váčků zprostředkovaných mikrotubuly v absorpčních tkáních helmintů [17]. Konkrétně tedy dochází k inhibici polymerace tubulinu. Inhibice polymerizace tubulinu může vést k inhibici progresu buněčného cyklu a vyvolat tak mitotickou katastrofu. Mikrotubuly jsou částí cytoskeletu a cytoskelet je nutný pro buněčné dělení a hraje tedy klíčovou roli v životaschopnosti buňky. Dále je potřebný pro buněčný transport a při udržování buněčné integrity. Mikrotubuly jsou složeny z α -tubulinových a β -tubulinových heterodimerů, které se dále formují do válcovitých struktur. Množstvím heterodimerů se tak ovlivňuje délka mikrotubulů. Pokud tato situace nastane, dochází k narušení struktury a tím i k narušení funkce mikrotubulů. Mikrotubuly tak nemohou správně fungovat, a to ovlivňuje mimo jiné i neschopnost absorpce glukózy a dalších živin. Dochází tak k rozvratu energetického metabolismu, to vede k vyčerpání zásob energie. Tím je ovlivněn buněčný cyklus, buňky se zastaví v G2 fázi buněčného cyklu a dochází k apoptóze, která vede ke smrti buněk [36, 39, 40]. Protože jsou mikrotubuly velmi významné a zajišťují několik životně důležitých funkcí buněk, dochází nakonec ke smrti organismu [38]. Tento mechanismus FLU je znázorněn na Obrázku 3.

U parazitických červů se benzimidazolová anthelmintika selektivně vážou na β -tubulin, což způsobuje jejich imobilizaci a smrt. Vazba benzimidazolových anthelmintik na tubulin hlístic, vykazuje 250–400krát větší inhibici polymerace ve srovnání s inhibicí u savců, což naznačuje selektivní toxicitu vůči parazitům [11]. Je známo, že benzimidazolová anthelmintika se vážou na kolchicin-senzitivní místo β -tubulinu a brání sestavení mikrotubulů, čímž narušují kaskádu buněčného dělení v metafázi, což nakonec vede ke smrti parazita [41]. Benzimidazoly také mohou způsobit například inhibici aktivity aminopeptidázy a katabolismu glutamátu, snížení vychytávání glukózy či zvýšení hladiny intracelulárního vápníku [36].

Ve fázi výzkumu je také varianta, že FLU způsobí inhibici fumarátreduktázy, a tím dochází k ovlivnění energetické produkce a poté ke smrti buňky [42]. FLU umí také vychytávat glukózu, tím se vyčerpají zásoby glykogenu, zabrání se tak tvorbě ATP, a to vede ke smrti parazita [23]. V GIT dochází k selektivní blokáde vychytávání glukózy, čímž se celý metabolismus glukózy změní [43].

Působení flubendazolu na helminty



Obrázek 3 Mechanismus flubendazolu v organismu. Vlastní zdroj.

1. 2. Imidazothiazoly

Imidazothiazoly prokazují anthelmintickou aktivitu a hojně se využívají k léčbě parazity. Imidazothiazoly působí jako antagonisté nikotinových acetylcholinových receptorů. Imidazothiazoly se naváží na tyto receptory, a tím způsobí paralýzu parazita [3]. Při léčbě se využívá kombinace s jinými léčivy nebo jejich deriváty [44]. Vykazují také insekticidní, protinádorovou nebo antimikrobiální aktivitu [45].

Imidazothiazolová struktura se skládá z dvou kruhů, a to z kruhu imidazolového a z kruhu thiazolového. Od benzimidazolů se strukturálně odlišují tím, že imidazothiazoly mají kruh thiazolu, zatímco benzimidazoly mají kruh benzenu. Imidazothiazoly a benzimidazoly mají tedy stejný kruh imidazolu [46].

Hlavním zástupcem imidazothiazolů je levamisol [46]. Jedná se o velmi účinné léčivo pro léčbu parazitem *H. contortus* u ovcí [47]. Využívá se nejen u ovcí, ale obecně je to velmi využívané anthelmintikum ve veterinární sféře. U lidí se příliš nepoužívá, avšak probíhají studie na léčbu kolorektálního karcinomu za využití levamisolu. Dříve se také používal k léčbě revmatoidní artritidy, AIDS a nefrotického syndromu. Levamisol je S-enantiomer fenyltetrahydroimidazothiazolu. Jeho R forma má velmi nízké anthelmintické účinky. Levamisol je bez zápachu a hydrofilní bílý prášek s bodem tání 228–230 °C. Jako volná báze má levamisol bod tání 61 °C [48].

1. 3. Makrocyclické laktony

Makrocyclické laktony (ML) jsou chemické látky, které pochází z půdních mikroorganismů jako je například rod *Streptomyces*. ML lze rozdělit do dvou kategorií, a to na avermektiny a milbemyciny. Mezi avermektiny lze zařadit mimo jiné doramektin, abamektin, ivermektin a selamektin. Zatímco mezi milbemyciny se řadí moxidektin a ixom. ML jsou selektivní agonisté chloridových kanálů řízených glutamátem. Tyto kanály jsou přítomny v neuronech a hltanových svalech hlístic a členovců, ale u člověka se nevyskytují. Inhibice těchto kanálů makrocyclickými laktony způsobí disfunkci hltanu [3]. Dochází ke zvýšení permeability membrán, což následně vede k hyperpolarizaci a paralýze na úrovni faryngálního a somatického svalstva parazitů. Další dopady má tento mechanismus například na reprodukční aktivitu helmintů. ML jsou vylučovány žlučí a trusem, přičemž 90 % látky je vyloučeno v původním stavu. Méně než 2 % léčiva jsou vyloučena močí a velice malá část je vyloučena mateřským mlékem [49].

Avermektiny mohou působit také antagonisticky proti receptorům kyseliny 4-aminomáselné nebo jako antagonisté nikotinových receptorů exprimovaných na somatických svalových buňkách parazitických hlístic [3]. Chemická struktura avermektinů reaguje na disacharid odvozený od 16členných pentacyklických laktonů, majících podobnou strukturu jako makrolidová antibiotika, ale bez antibakteriální nebo antifungální aktivity [49].

Ivermektin má silné anthelmintické a insekticidní účinky. Je podáván perorálně, a to v terapeutických dávkách 150 až 200 µg/kg. Jde o selektivní pozitivní alosterický modulátor glutamátém ovládaných chloridových kanálů a může být také využíván jako alosterický modulátor iontových kanálů v centrální nervové soustavě [50]. Ivermektin je hojně využíván u koní. Dále se používá u přežvýkavců a prasat. Je jediným léčivem z této skupiny, která se může používat i u lidí. Vyznačuje se vysokou bezpečností z hlediska toxicity při použití. Ivermektin je velmi lipofilní léčivo a obecně je jeho farmakokinetika u domácích druhů charakterizována pomalou fází absorpce, extenzivní distribucí, slabou metabolizací a pomalým vylučováním, především stolicí [51].

Na rozdíl od avermektinů se u milbemycinů nenachází disacharidová skupina na C13 [49]. Uhlíkový skelet milbemycinu je odvozen ze sedmi acetátových jednotek a pěti propionátových jednotek. Skupiny C-25 jsou odvozeny od acetátu, propionátu a isobutyrátu nebo valinu, v daném pořadí. Methoxylová skupina na C-5 je z L-methioninu [52]. Milbemyciny se používají převážně u domácích zvířat jako jsou psi a kočky. Vyznačují se nízkou toxicitou. Deriváty milbemycinu jsou milbemektin, lepimektin, latidektin a milbemycin oxim [49].

1. 4. Deriváty aminoacetonitrilu

Jedná se o syntetická anthelmintika. Využívají se především pro léčbu ovcí nakažených parazity rezistentními na benzimidazoly, imidazothiazoly a makrocyclické laktony. Hlavním zástupcem této skupiny je monepantel [3]. Monepantel byl uveden na trh v roce 2009 a léčivo monepantelu se nazývá Zolvix. Doporučená dávka monepantelu je 2,5 mg/kg [53]. Bohužel v posledních letech byl zaznamenán nárůst rezistence hlístů i na tuto skupinu léčiv [54].

2. Přehled redukujících enzymů

Enzymy, které metabolizují xenobiotika v organismu lze rozdělit do dvou skupin. První skupina jsou enzymy v první fázi biotransformace a jedná se o enzymy oxidační, hydrolytické a redukční. Konkrétně do kategorie enzymů první části biotransformace řadíme cytochromy P450, flavinové monooxygenázy, aldo-ketoreduktázy (AKR), dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (SDR) a dehydrogenázy/reduktázy se středně dlouhým řetězcem. Další skupinou jsou enzymy v druhé fázi biotransformace a do této kategorie se řadí konjugační enzymy. Do skupiny konjugujících enzymů spadá například UDP-glukuronosyltransferáza, glutathion-S-transferáza nebo sulfontransferáza. Eliminace xenobiotik v organismu se také účastní transportní proteiny [55].

Enzymy, které katalyzují oxidaci nebo redukci, se nazývají oxidoreduktázy. Tyto enzymy mají klíčovou roli v organických syntézách. Redukovat mohou aromatické sloučeniny, karbonylové skupiny nebo se může jednat o redukční aminace [56]. Redukcí mohou vzniknout nová chirální centra a nové funkční skupiny. Redukcí aldehydu a ketonu vznikne sekundární alkohol. Redukce zprostředkovávají enzymy nejčastěji dvou nadrodiv, a to aldo-ketoreduktázy (AKR) a reduktázy/dehydrogenázy s krátkým řetězcem (SDR) [57].

Většina oxidoreduktáz využívá jako redukční činidlo redukované nikotinamidadeninukleotidové kofaktory (NADPH nebo NADP). V průběhu redukční reakce se NAD(P)H oxiduje na NAD(P)⁺. Redukovaná forma NADPH musí být regenerována, aby se zabránilo možným inhibičním mechanismům [56].

Jednou z hlavních nadrodiv NADPH dependentních oxidoreduktáz jsou AKR. Jedná se o pluripotentní enzymy. AKR se řadí do 16 rodin a má více než 190 členů (Tabulka 1). Jedná se o enzymy, které redukují karbonylové substráty. AKR jsou monomery, které mají obvykle 37 kDa. AKR mají schopnost katalyzovat mechanismus za pomoci kofaktoru NADPH, které do reakce vstupuje jako první a zároveň vychází z reakce jako poslední. U člověka existuje 15 AKR. AKR jsou také popisovány v souvislosti s maligními onemocněními, diabetickými problémy, absencí žlučových kyselin nebo poruchami spojenými s kyselinou retinovou [57]. V Tabulce 1 je sepsán přehled enzymů AKR.

Tabulka 1 Přehled enzymů AKR. Převzato a upraveno z [57].

Zkratka rodiny	Enzym rodiny
AKR1	aldehydové reductázy, aldózové reductázy, hydroxysteroidní dehydrogenázy a steroidní 5p-reductázy
AKR2	manóza a xylózareductázy
AKR3	kvasinkové AKR
AKR4	chalkonové a kodeinonové reductázy
AKR5	reductázy kyseliny glukonové
AKR6	p-podjednotky napěťových kanálů s draslíkovou bránou
AKR7	aflatoxin dialdehyd a sukcinát semialdehyd reductázy
AKR8	pyridoxal reductázy
AKR9	arylalkoholdehydrogenázy
AKR10	<i>Streptomyces</i> AKRs
AKR11	<i>Bacillus</i> AKRs
AKR12	<i>Streptomyces</i>
AKR13	reductázy hypertermofilních bakterií
AKR14	<i>E. coli</i>
AKR15	reductázy <i>Mycobacterium</i>
AKR16	reductázy <i>V. cholera</i>

SDR rodina má více než 47 000 členů, z toho 80 členů bylo identifikováno v lidském genomu. Všechny tyto enzymy mají stejnou podobu jádra, a to konkrétně Rossmannův záhyb, který se skládá ze sedmi paralelních β -listů, které jsou ohraničeny třemi α -helixy na každé straně. Tato struktura je velice důležitá pro navázání NADPH. I přesto, že SDR mají podobné struktury, jejich sekvenční podoba se pohybuje mezi 20-30 %. Existují také další formy SDR, které mají navázány další struktury na C-konci nebo N-konci [57]. SDR rodina se skládá z oxidoreduktáz, izomeráz a lyáz. Na základě mírných odlišností byly enzymy SDR rozděleny do šesti skupin, a to na klasické, rozšířené, střední, divergentní, komplexní a atypické SDR. U většiny klasických SDR bylo popsáno, že preferují NADPH, zatímco většina rozšířených SDR preferuje NADH [58]. SDR se účastní metabolismu široké škály molekul, včetně steroidních

hormonů, oxysterolů, žlučových kyselin, prostaglandinů, retinoidů, mastných kyselin, aminokyselin, cukrů a různých xenobiotik [57]. Mezi SDR enzymy patří karbonylreduktáza 1 (CBR1, SDR21C1), karbonylreduktáza 3 (SDR21C2), karbonylreduktáza 4 (SDR45C4), reduktáza L-xylulózy (SDR20C1) nebo například 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typ 1 (SDR26C1) [55].

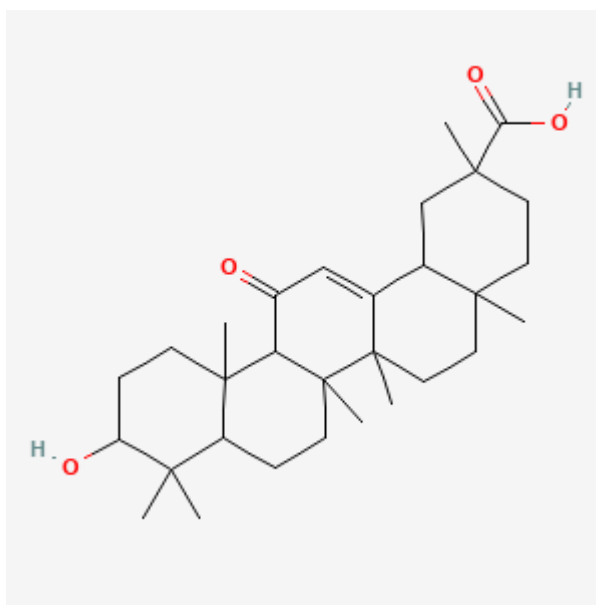
2. 1. Přehled potenciálních inhibitorů reduktáz

Inhibice některých enzymů SDR a AKR může vyvolat některé poruchy a onemocnění. Zároveň se mechanismus enzymů AKR a SDR dá využít i terapeutické oblasti [59]. Mezi inhibitory reduktáz se řadí známé látky, které mají širokou škálu využití a jsou to látky jak syntetické, tak látky přírodního původu. Zároveň u těchto látek je možný potenciál kardioprotektivních vlastností a také se zkoumá jejich chemosensibilizační aktivita [60].

Mezi studované inhibitory reduktáz patří flavonoidy. Nejsilněji inhibují flavonoidy karbonylreduktázu 1. Flavonoidy se na CBR1 navazují díky hydroxylové skupině na uhlících C5 a C7 a zároveň díky karbonylové skupině na C4. Látkou s nejsilnějším inhibičním účinkem by v tomto kontextu měl být podle studií luteolin. Další skupinou jsou chalkony. Chalkony jsou přírodní látky a mimo jiné prokazují protirakovinné účinky. Jednou z nejúčinnějších sloučenin je 2',4',2-trihydroxychalkon [60]. Mezi další inhibitory lze zařadit anthronové a antrachinonové deriváty, polyfenoly, kurkuminy [61, 62].

2. 1. 1. Kyselina glycerhetinová

Kyselina glycerhetinová je hlavní bioaktivní sloučenina lékořice. Používá se v lékařství především pro své protizánětlivé a antineoplastické účinky [63]. Kyselina glycerhetinová figuruje jako hlavní aktivní složka kořene lékořice, který obsahuje od 2 % do 25 % kyseliny glycerhetinové [64]. Na Obrázku 4 je znázorněna struktura kyseliny glycerhetinové.



Obrázek 4 Struktura kyseliny glycyrrhetinové. Převzato z [64].

Synonymy jsou kyselina 18 β -glycyrrhetinová, 3 β -hydroxy-11-oxo-18 β ,20 β -olean-12-en-29-ová kyselina a enoxolon [64]. Vlastnosti kyseliny glycyrrhetinové jsou sepsány v Tabulce 2.

Tabulka 2 Vlastnosti kyseliny glycyrrhetinové. Převzato a upraveno z [64].

Kyselina glycyrrhetinová	
Název IUPAC	10-hydroxy-2,4a, 6a, 6b, 9,9,12a - heptamethyl-13-oxo-3,4,5,6,6a, 7,8,8a, 10,11, 12,14b - dodekahydro-1H - picen-2-karboxylová kyselina
Molekulární vzorec	C ₃₀ H ₄₆ O ₄
Molekulární hmotnost	470,7 g/mol
Rozpustnost	DMSO
Ner rozpustnost	Voda

Především díky tomu, že se vyznačuje pestrou škálou účinků, jako jsou antioxidační, protizánětlivé, protinádorové, hepatoprotektivní, kardioprotektivní, antivirové, neuroprotektivní a antimikrobiální účinky, je tato látka hojně využívána v dermatologii a kosmetologii. Výhodou je také fakt, že alergická kontaktní dermatitida spojená s užíváním kyseliny glycyrrhetinové je pozorována pouze velmi vzácně. Kyselina glycyrrhetinová a její deriváty tedy vykazují pozoruhodné široké spektrum biologických a farmakologických aktivit. Dále je možné kyselinu glycyrrhetinovou využít také jako čistý extrakt z kořene lékořice, který lze použít k léčbě atopické dermatitidy, pruritu a acne vulgaris. Další využití nalezneme u

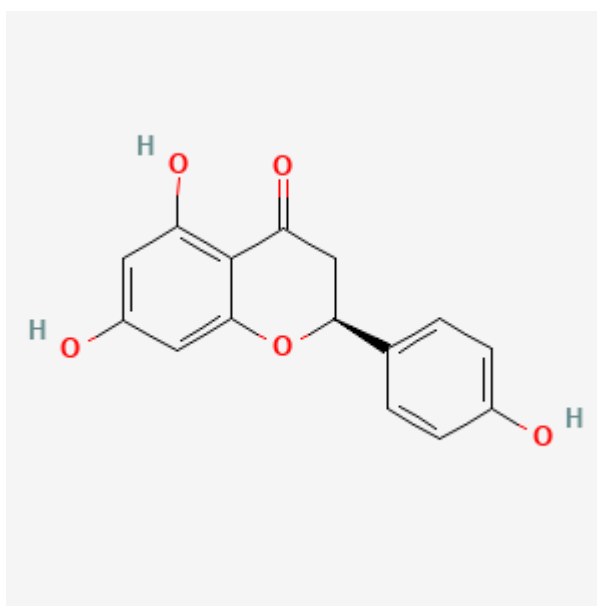
zmírnění nežádoucích účinků spojených s poškozením pokožky důsledkem UV záření, jako je erytém a pigmentace [65].

Kyselina glycerhetinová má také některé nežádoucí fyzikálně – chemické vlastnosti. Zařadit mezi ně můžeme například nedostatečnou lipofilitu, nízkou rozpustnost ve vodě, a s tím související špatnou biologickou dostupnost. Naštěstí existuje mnoho farmaceutických technologií, které se zabývají zlepšením permeace, a tedy zvýšení biologické dostupnosti této zajímavé sloučeniny [65]. Pro zlepšení účinnosti z hlediska nerozpustnosti ve vodě se zkoumají například lipozomy na bázi polyethylenglykol PEG-7 glycerylkokoátu. Tyto PEG-modifikované lipozomy jsou efektivnější díky příznivější velikosti a tvaru částic, jsou tedy účinnější a stabilnější než nemodifikované lipozomy. Bylo také zjištěno, že vykazují dobrou depozici léčiva na úrovni epidermis během studie *in vitro*. Dále se také pro lepší permeaci kyseliny glycerhetinové používají mikrokapsle, pevné lipidové nanočástice nebo nanostrukturní lipidové nosiče [63].

Kyselina glycerhetinová prokázala nízkou cytotoxicitu vůči normálním lidským keratinocytům. Přibližně 80 % buněk přežilo při koncentracích nižších než 30 μM . Další z vlastností kyseliny glycerhetinové je schopnost chránit kultury lidských keratinocytů před poškozením UVB zářením a může také může zabránit oxidativní fragmentaci DNA a indukci rakoviny kůže [65].

2. 1. 2. Naringenin

Naringenin je flavonoid, který patří do podtřídy flavanonů. Je široce obsažen v plodech citrusů, bergamotu, rajčatech a dalším ovoci. V rámci třídy flavonoidů je naringenin flavanon, který pochází z hydrolýzy naringinu nebo narirutinu, což je jeho prekurzor [66]. Naringenin vzniká kondenzací para-kumaroyl-CoA se třemi jednotkami malonyl-CoA. Naringenin je zároveň spouštěcí jednotkou biosyntézy naringenininu para-kumaroyl-CoA, který se u dvouděložných rostlin vzniká z fenylalaninu [67]. Schéma syntézy naringenininu je na Obrázku 6. Na obrázku 5 je znázorněna struktura naringenininu.



Obrázek 5 Struktura naringenininu. Převzato z [23].

Další názvy naringenininu jsou salipurool, salipurpol, (S)-5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)chroman-4-on a naringetol. Tato široce distribuovaná molekula je nerozpustná ve vodě a rozpustná v organických rozpouštědlech, jako je alkohol [66]. Vlastnosti naringenininu jsou zaznamenány v Tabulce 3.

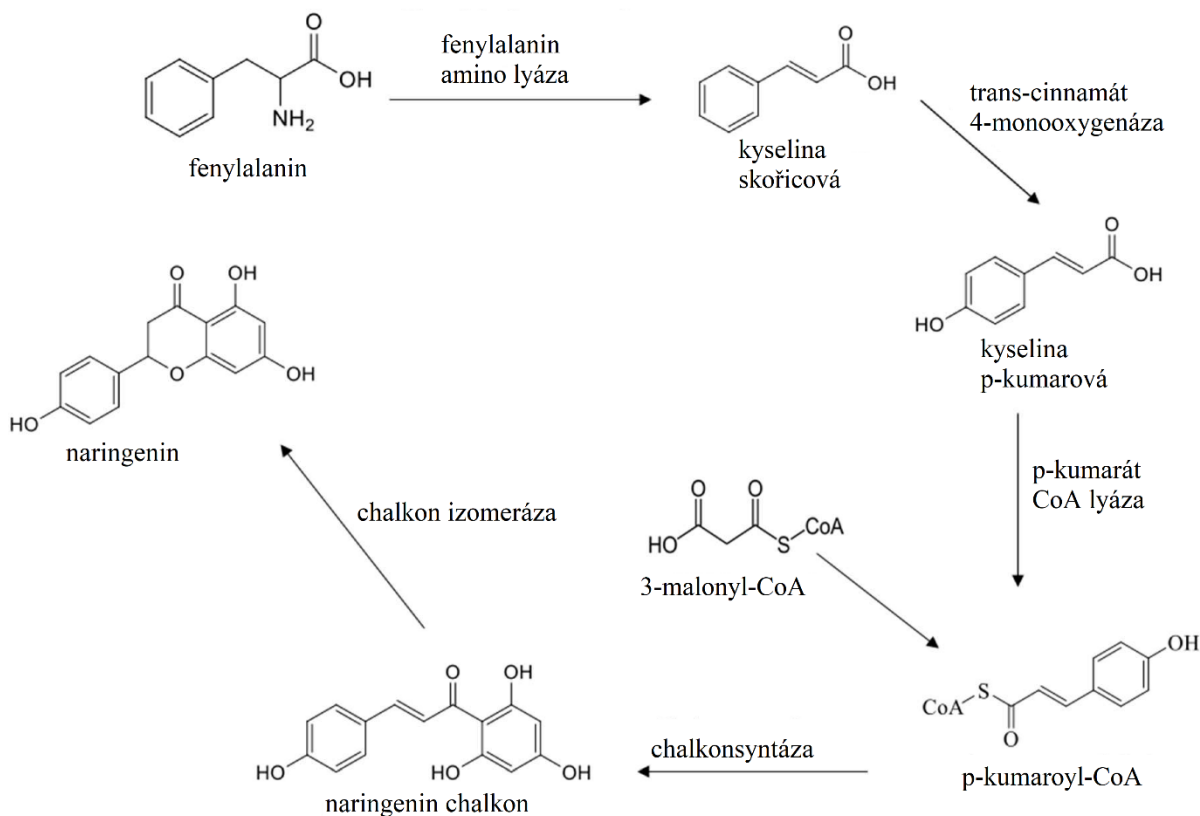
Tabulka 3 Vlastnosti naringeninu. Převzato z [66, 68].

Naringenin	
Název IUPAC	(2S) -5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrochromen-4-on
Molekulární vzorec	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
Molekulární hmotnost	272,25 g/mol
Bod tání	251 °C
Rozpustnost	Organická rozpouštědla
Nerozpustnost	Voda

Mezi popsané biologické aktivity naringeninu patří účinky antioxidační, protinádorové, antivirové, antibakteriální, protizánětlivé, antiadipogenní a kardioprotektivní [66]. Naringenin má široké biologické účinky na lidské zdraví, které zahrnují snížení biomarkerů peroxidace lipidů a karboxylaci proteinů, podporuje metabolismus sacharidů, zvyšuje antioxidační obranu, zachycuje reaktivní formy kyslíku, moduluje aktivitu imunitního systému a také působí antiaterogenně [69].

Bohužel je tento bioflavonoid při orálním požití špatně vstřebáván organismem. Pouze 15 % podaného naringeninu se absorbuje v lidském gastrointestinálním traktu, proto probíhají další výzkumy zaměřující se na biologickou dostupnost naringeninu [68].

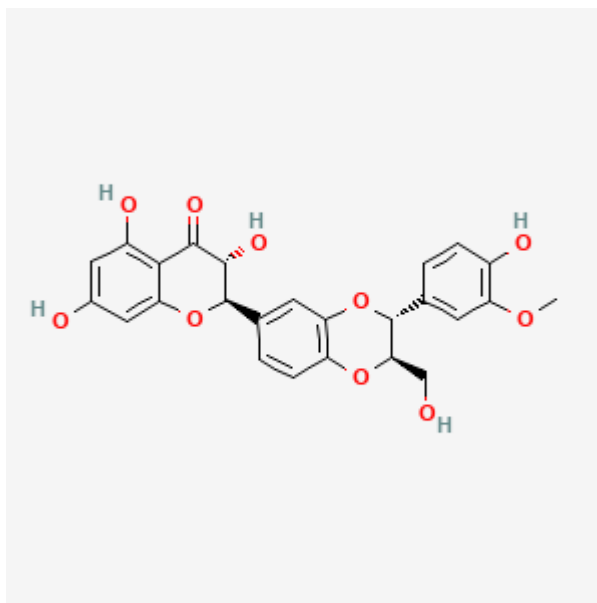
Bylo také popsáno, že naringenin má významnou schopnost modulovat signální dráhy související s metabolismem mastných kyselin, podporuje beta oxidaci mastných kyselin, zabraňuje akumulaci lipidů v hepatocytech, a tím působí protektivně na játra. Zároveň však účinně narušuje akumulaci plazmatických lipoproteinů [66]. Kromě toho naringenin zesiluje intracelulární signální reakce na nízké dávky inzulínu senzibilizací hepatocytů na inzulín. Naringenin je schopen procházet skrz hematoencefalickou bariéru a vyvíjet různé neuronální účinky, a to díky své schopnosti interagovat se signálními cestami proteinkinázy C [69].



Obrázek 6 Vznik naringeninu. Převzato a upraveno z [66].

2. 1. 3. Silybin

Silybin je flavonolignan izolovaný z ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Jedná se o polyfenol, aromatický ether, benzodioxin a sekundární alfa-hydroxyketon. Některé látky obsažené v ostropestřci mariánském, mezi které se řadí i silybin, vykazují antioxidační a antineoplastické aktivity. Může mít roli antioxidantu, antineoplastického či hepatoprotektivního činidla [70]. Struktura silybinu je vyobrazena na Obrázku 7. V Tabulce 4 jsou shrnuty vlastnosti silybinu.



Obrázek 7 Struktura silybinu. Převzato z [70].

Tabulka 4 Vlastnosti silybinu. Převzato z [70].

Silybin	
Barva	žlutá
Název IUPAC	(2R,3R) -3,5,7-trihydroxy-2-[(2R,3R) -3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro -1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydrochromen-4-on
Molekulární vzorec	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀
Molekulární hmotnost	482,4 g/mol
Rozpustnost	DMSO, aceton, DMF, THF
Nerozpustnost	Chloroform, petrolether

Tato molekula nepodléhá redukci, ale snadno se oxiduje na 2,3-dehydrosilybin. Vliv silné báze nebo dlouhodobé zahřívání nad 100 °C způsobuje denaturaci. Silybin je považován za bezpečný bez významných nežádoucích účinků, s výjimkou možných gastrointestinálních dysfunkcí [71].

Silybin je hlavní aktivní složkou silymarinu, což je standardizovaný extrakt ze semen ostropestřce mariánského. Tento extrakt obsahuje směs flavonolignanů sestávající ze silibynu, isosilibininu, silicristinu, silidianinu a dalších. Silybin je prezentován jako směs dvou diastereomerů, a to ze silybinu A a silybinu B v přibližně ekvimolárním poměru. Výzkumy *in vitro* i na zvířatech *in vivo* naznačují, že silybin má hepatoprotektivní (antihepatotoxické) vlastnosti, které chrání jaterní buňky před toxiny. Silybin také prokázal *in vitro*

antikancerogenní účinky proti buňkám lidského adenokarcinomu prostaty, na estrogeneru závislým a nezávislým buňkám lidského karcinomu prsu, buňkám lidského ektocervikálního karcinomu, lidským buňkám rakoviny tlustého střeva a malým i nemalým buňkám lidského karcinomu plic [70].

Klinické aplikace silybinu však vykazují určitá omezení kvůli nízké rozpustnosti ve vodě, špatné penetraci do epiteliálních buněk střeva, vysokému metabolismu a rychlé systémové eliminaci [71]. K překonání těchto problémů ukázala nanotechnologie velký potenciál pomocí různých nosičů, jako jsou lipidové nanočástice, lipozomy, nanokrystaly, inkluzní komplexace s cyklodextrinem, nanoemulzí, polymernímimicelami a magnetickými nanočásticemi pro zlepšení absorpce ve vodě nerozpustných léčiv a je považována za slibný přístup ke snížení vedlejších účinků a zlepšení cíleného a pro zlepšení absorpce ve vodě nerozpustných léčiv a je považována za slibný přístup ke snížení vedlejších účinků a zlepšení cíleného a trvalého uvolňování léčiva [72].

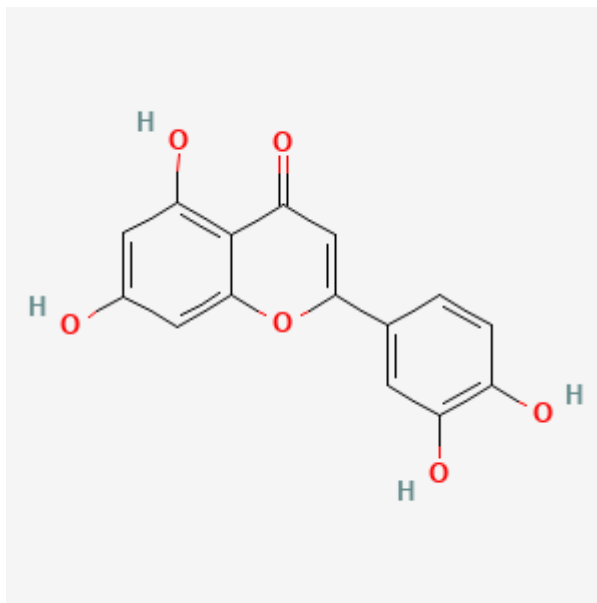
Silybin je považován za malou, vysoce funkcionalizovanou molekulu a ve své struktuře obsahuje pět hydroxylových skupin, které lze rozdělit do tří kategorií podle jejich povahy, tři fenolické, jednu sekundární a jednu primární alkoholickou skupinu [71]. Struktura silybinu se skládá ze dvou hlavních jednotek. První je založen na taxifolinu, což je skupina flavonolů. Druhým je fenylypropanoidová jednotka, kterou je v tomto případě conyferil alkohol. Tyto dvě jednotky jsou spojeny do jedné struktury oxeranovým prstencem [73].

Silybin je vysoce rozpustný v polárních aprotických rozpouštědlech, jako je dimethylsulfoxid (DMSO), aceton, dimethylformamid (DMF) a tetrahydrofuran (THF) a nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech, jako je chloroform a petrolether Tato molekula není redukcí zcela ovlivněna, ale snadno se oxiduje na 2,3-dehydrosilybin. Dlouhodobé ovlivnění silnou bazí nebo zahřívání nad teplotu 100 °C může narušit jeho strukturu. U silybin nebyly nalezeny žádné větší nežádoucí účinky kromě gastrointestinálních dysfunkcí. Silybin má dva izomery, a to silybin A a silybin B [71]. Vylučování silybinu může být sníženo, pokud se kombinuje s cyklosporinem, riboflavinem, citrulinem, kyselinou listovou, nebo aspartamem [72].

2. 1. 4. Luteolin

Luteolin je tetrahydroxyflavon a 3'-hydroxyflavonoid. Obsahuje čtyři hydroxylové skupiny, které jsou umístěny v pozicích 3', 4', 5' a 7'. Jedná se o přírodní flavonoid, který se vyskytuje v mnoha rostlinách. Má vysoké zastoupení například v ovoci a

zelenině. Jmenovitě to jsou například paprika, mrkev obecná, brokolice, petržel, listy cibule, celer nebo květy chryzantém [74, 75]. Jeho struktura se nachází na Obrázku 8.



Obrázek 8 Struktura luteolinu. Převzato z [75].

Tabulka 5 Vlastnosti luteolinu. Převzato z [75].

Luteolin	
Barva	žlutá
Název IUPAC	2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-on
Molekulární vzorec	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Molekulární hmotnost	286,24 g/mol
Bod tání	329,5 °C
Bod varu	616 °C
Rozpuštnost při 25 °C	387,5 mg/l
Rozpuštnost	Voda

Vlastnosti luteolinu jsou popsány v Tabulce 5. Luteolin má mnoho využití například jako antioxidant, lapač volných radikálů, protizánětlivý prostředek a modulátor imunitního systému, stejně jako je aktivní proti několika rakovinám. Má roli jako inhibitor syntázy mastných kyselin, antineoplastické činidlo, antagonistu receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, nefroprotektivní činidlo, inhibitor angiogeneze, protizánětlivé činidlo a induktor apoptózy [75].

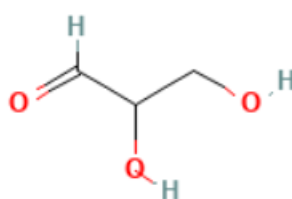
Luteolin vykazuje četné biologické účinky, jako jsou protizánětlivé, protialergické a protirakovinné účinky, a může biochemicky fungovat buď jako antioxidant, nebo prooxidant. Kromě toho některé vlastnosti luteolinu mají synergní účinek; například

protizánětlivá aktivita může být spojena s její protirakovinnou vlastností. Flavonoidy, jako je luteolin, jsou důležité přírodní antioxidanty, které mají silné protirakovinné účinky za podmínek *in vitro* i *in vivo* [74].

Luteolin je také studován v rámci onkologie. Po podání luteolin vylučuje volné radikály, chrání buňky před poškozením vyvolaným reaktivními formami kyslíku (ROS) a indukuje přímou zástavu buněčného cyklu a apoptózu v nádorových buňkách. To inhibuje proliferaci nádorových buněk a potlačuje metastázy [75].

2. 1. 5. Glyceraldehyd

Glyceraldehyd je zásadní metabolit a jedná se o přírodní produkt. Hraje roli při tvorbě konečných produktů pokročilé glykace (AGE), které jsou škodlivými průvodními jevy stárnutí. Jedná se o triósový monosacharid. Glyceraldehyd je tedy aldtrióza, která obsahuje propanal a v polohách 2 a 3 má navázané hydroxyskupiny. Je tak nejjednodušší formou všech aldóz. Glyceraldehyd lze také popsat jako glycerin s jednou změnou, a to změna jedné hydroxylové skupiny na aldehydickou skupinu. Struktura glyceraldehydu je znázorněna na Obrázku 9. Glyceraldehyd je významná látka ve farmacii, v kosmetickém průmyslu, v organické chemii [76]. Vlastnosti glyceraldehydu jsou zaznamenány v Tabulce 6.



Obrázek 9 Struktura glyceraldehydu. Převzato z [76].

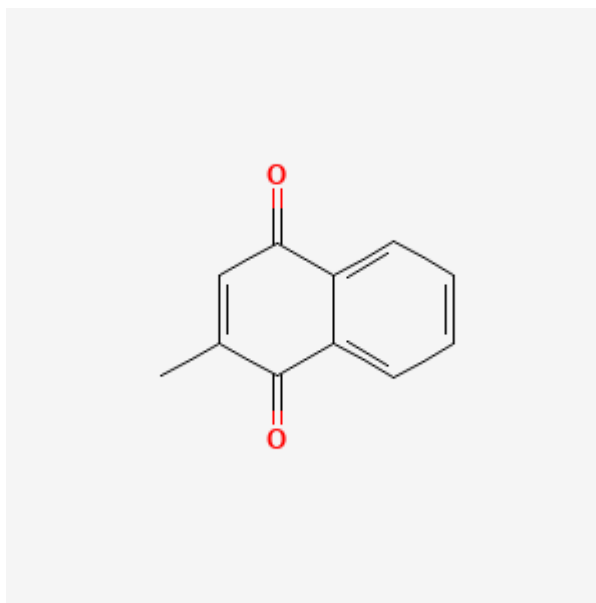
Tabulka 6 Vlastnosti glycerinaldehydu. Převzato z [76].

Glycerinaldehyd	
Barva	Bílá
Název IUPAC	2,3-dihydroxypropanal
Molekulární vzorec	C ₃ H ₆ O ₃
Molekulární hmotnost	90,08 g/mol
Bod tání	145 °C
Rozpustnost při 30 °C	17 mg/ml
Rozpustnost	Voda

Glycerinaldehyd se zkoumá v oblasti možné léčby a prevence Alzheimerovy choroby, kde by mohl zmírnit poškození neuronů a působit jako inhibitor glykolýzy. Glycerinaldehyd má velký vliv na buněčný metabolismus a na hladiny ATP uvnitř buňky [77]. Cytotoxické účinky glycerinaldehydu jsou vhodné pro léčbu neuroblastomu, a to díky způsobení apoptózy v kombinaci s inhibicí glykolýzy a indukci glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy [78].

2. 1. 6. Menadion

Menadion je členem třídy 1,4-naftochinonů. Používá se jako doplněk výživy a k léčbě hypoprotrombinémie. Má roli jako potravinový doplněk, jedná se také o inhibitor angiogeneze, inhibitor hlavní proteinázy SARS koronaviru a antineoplastického činidla [79]. Výzkumy prokázaly širokou škálu biologických aktivit menadionu. Má účinky protirakovinné, antibakteriální, antimykotické, antimalarické a anthelmintické [80].



Obrázek 10 Struktura menadionu. Převzato z [80].

Mezi další názvy menadionu patří Vitamín K3, 2-methylnaftalen-1,4-dion a 2-methyl-1,4-naftochinon [80]. Tabulka 7 shrnuje vlastnosti menadionu.

Tabulka 7 Vlastnosti menadionu. Převzato z [79].

Menadion	
Barva	žlutá
Název IUPAC	2-methylnaftalen-1,4-dion
Molekulární vzorec	C ₁₁ H ₈ O ₂
Molekulární hmotnost	172,18 g/mol
Bod tání	107 °C
Rozpustnost při 30 °C	160 mg/l
Rozpustnost	Ethylether, benzen, chloroform, kyselina sírová
Mírně rozpustnostný	Ethanol, kyselina octová

Menadion je syntetický naftochinon bez isoprenoidního postranního řetězce a biologické aktivity, ale může být po alkylnaci *in vivo* přeměněn na aktivní vitamín K2 neboli menachinon. Menadion se jako doplněk stravy běžně neužívá, i přesto, že by mohl sloužit jako

prekurzor vitamínu K. Je to z důvodu vedlejších účinků menadionu při jeho podávání ve zvýšeném množství. Byly zaznamenány případy, kdy velké dávky menadionu zapříčinily nepříznivé účinky na zdraví, včetně hemolytické anémie v důsledku nedostatku glukóza – 6 fosfátdehydrogenázy (G6PD), novorozenecké poškození mozku nebo jater, nebo v některých případech vedly i k neonatální smrti. Menadion je ve vysokých koncentracích velmi toxický. Někdy se mu říká vitamín K3, ačkoli jde o deriváty naftochinonu bez postranního řetězce v poloze 3 nemůže vykonávat všechny funkce vitamínů K. Menadion je vitaminový prekurzor K2, který využívá alkylaci v játrech za vzniku menachinonů, a proto je lépe klasifikován jako provitamin [79].

Menadion se v přírodě nevyskytuje. Je používán jako prekurzor vitamínu K1 a K2. Vitamíny K tělo získává potravou a jsou pro organismus důležité například v oblasti krevního srážení nebo regulaci kalcifikace kostí. U zvířat může být menadion přeměněn na vitamín K2 ve střevním traktu prostřednictvím střevní mikroflóry. U lidí dochází k přeměně menadionu na vitamín K2 po jeho alkylaci v játrech. Navíc u dospělých lidí může být vitamín K1 přeměněn na vitamín K2, což je proces, který vyžaduje menadion jako meziproduct [79].

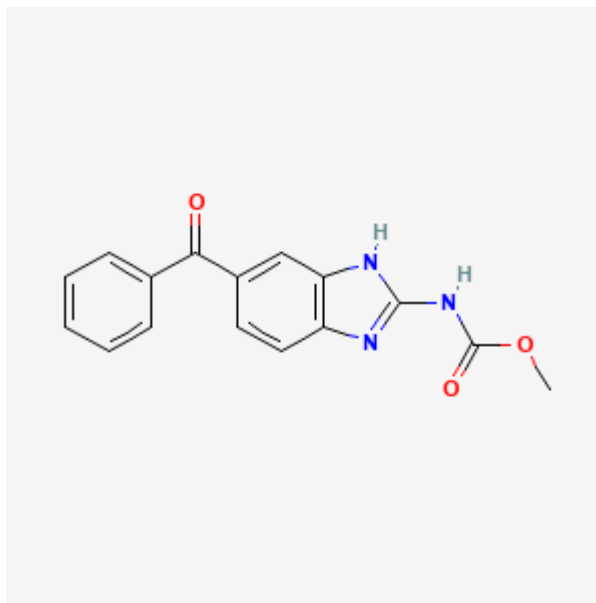
Komplex menadionu je ve vodě rozpustný derivát přeměněný v těle na menadion. MSB podporuje tvorbu protrombinu a urychluje koagulaci krve, čímž zlepšuje její antihemoragickou aktivitu ve srovnání s přírodními vitamíny K [80].

Bohužel v některých situacích může docházet ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS), a to v redoxním cyklu menadionu. Dochází k interakci mezi nukleofilními biomolekulami a 1,4-naftochinonovým jádrem menadionu a jeho derivátů [80].

2. 1. 7. Mebendazol

Mebendazol je širokospektré anthelmintikum, které se běžně používá při infekcích helminty, tasemnicemi, škrkavkami a dalšími infekcemi parazitickými červy. Nedoporučuje se podávat delší dobu ve vysokých dávkách, a to z důvodu možného poškození jater a také zvýšení hladin enzymů v séru. Mebendazol je syntetický derivát benzimidazolu. Struktura mebendazolu je znázorněna na Obrázku 11. Mebendazol ovlivňuje reprodukci helmintů a celkové přežití helmintů. Způsobuje inhibici tvorby jejich cytoplazmatických mikrotubulů, čímž selektivně a nevratně blokuje vychytávání glukózy. To má za následek vyčerpání zásob glykogenu a vede ke snížené tvorbě ATP, která je potřebná pro přežití a reprodukci

helminta. To nakonec způsobí smrt helmintů. Mebendazol je aktivní složkou například produktů Emverm a Vermox [81]. Vlastnosti mebendazolu jsou sepsány v Tabulce 8.



Obrázek 11 Struktura mebendazolu. Převzato z [81].

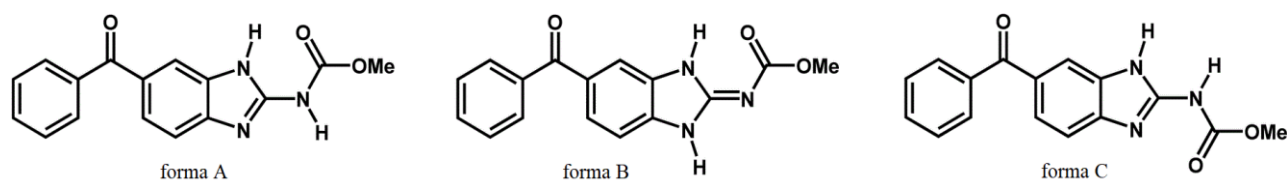
Tabulka 8 Vlastnosti mebendazolu. Převzato z [81].

Mebendazol	
Barva	Bílá až nažloutlá
Název IUPAC	methyl- <i>N</i> -(6-benzoyl-1H - benzimidazol-2-yl) karbamát
Molekulární vzorec	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃
Molekulární hmotnost	295,29 g/mol
Bod tání	288,5 °C
Rozpustnost při 25 °C	71,3 mg/l
Rozpustnost	Kyselina mravenčí
Nerozpustnost	Voda, ethanol, ether, chloroform

Tato látka se špatně se vstřebává z gastrointestinálního traktu. Přibližně se vstřebá z celkového množství 5 % až 10 % látky. Vyšší vstřebatelnost můžeme docílit podáváním v kombinaci s tuky. U člověka se přibližně 2 % podaného mebendazolu eliminuje močí a zbytek stolicí jako nezměněné léčivo nebo primární metabolit (2-aminoderivát). U lidí se jako maximální dávkování udává 100 mg dvakrát denně po dobu 3 dnů, a to tedy ve výsledku nesmí přesahovat sérovou koncentraci více než 0,03 µg/ml, přičemž při léčbě maximální sérová

koncentrace dosahuje hodnot 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Doba dosažení maximální sérové koncentrace je pohybuje okolo 2 až 5 hodin [81].

Mebendazol se může objevovat ve třech polymorfních formách. Struktura těchto forem se nachází na Obrázku 12. Jedná se o formu A, formu B a C. Anthelmintickou aktivitu nejvíce vykazuje forma C, která je zároveň nejúčinnější. Forma B je izomerní forma mebendazolu, vykazující toxicitu na různých lidských buněčných modelech. Jedná se také o nejvíce lipofilní formu. Co se týká formy A, její aktivita vůči helmintům je velmi nízká. Každá forma má trochu odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, což způsobuje různou interakci k vazebným biologickým receptorům. Stejně jako ostatní benzimidazoly vykazuje aktivitu v oblasti anthelmintické, antivirové, antihypertenzní a protirakovinné. Má tedy širokospektré využití. Mezi další výhody mebendazolu patří například snadné podávání, nízká cena a prostudovaná nízká toxicita. V posledních letech je mu věnována pozornost z jako možnému léku pro onkologické pacienty. Je zkoumána například konformace C v oblasti nádorů mozku [82].



Obrázek 12 Formy mebendazolu. Převzato a upraveno z [83].

3. Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*)

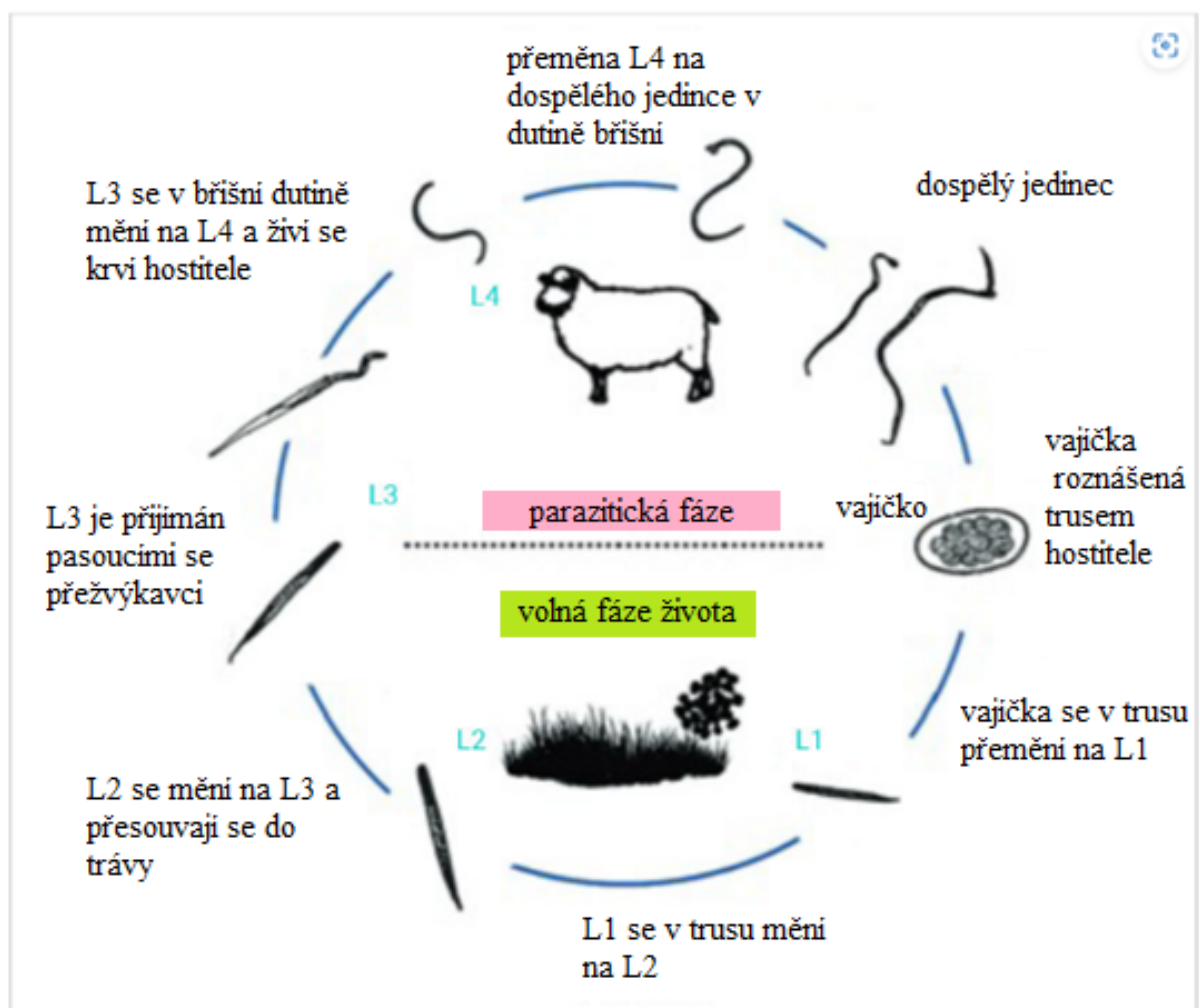
H. contortus je vysoce patogenní gastrointestinální parazit kmene Nematoda, třída *Secernentea*, řád *Strongylida* a čeledi *Trichonstrongylidae* [84]. Taxonomie vlasovky slezové je zaznamenána v Tabulce 9. Vlasovka slezová parazituje v žaludku postižených zvířat. Konkrétně ve čtvrté části žaludku, tedy ve slezu (*abomasum*), kde je přichycena k abomasální sliznici. Svou patogenní činnost projevuje sáním krve, což je pro zdraví zvířat velmi nepříznivé a celkově to ovlivňuje zdraví a produktivitu zvířat [85]. Hemonchóza je onemocnění definované jako infekce parazitem *Haemonchus contortus* [86]. Jedná se o významnou a běžnou parazitární infekcí malých přežvýkavců. Tento parazit je rozšířen po celém světě, a to celkem nerovnoměrně. Vyskytuje se především v teplých, mírných a letních dešťových oblastech než v chladných a studených mírných a suchých oblastech [85]. Pro přežití vlasovky slezové je tedy vhodné teplé a vlhké prostředí. Optimální podmínky pro líhnutí vajíček a vývoj larev *H. contortus* nastávají při teplotách okolního vegetačního mikroklimatu 22 až 26 °C a vlhkosti blízké 100 %. Vlasovka slezová parazituje především u malých přežvýkavců jako jsou ovce a kozy [84]. V určitých případech může také napadnout skot a velbloudy, lamy a alpaky. U velbloudů lam, a alpak však nesídlí v čtvrté, ale ve třetí části žaludku [87].

Tabulka 9 Taxonomie vlasovky slezové. Převzato z [84].

Kmen	Nematoda
Třída	Secernentea
Řád	Strongylida
Čeleď	Trichonstrongylidae

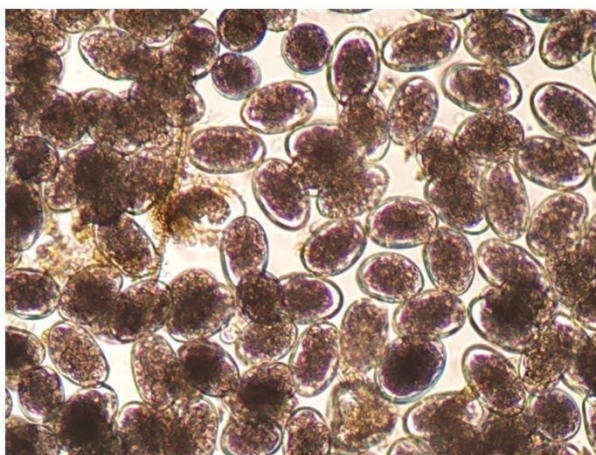
Cyklus helmintů, který je shrnutý na obrázku 13, je často složitý zahrnující mezihostitele [2]. Vlasovka slezová má dvoufázový přímý životní cyklus. První období je ve fázi vajíček a larev. Vajíčka vlasovky jsou zobrazeny na Obrázku 14. Druhé období je parazitická fáze ve slezu hostitele jako larvy a poté dospělí červi [87]. Jsou-li přítomny ideální podmínky prostředí, může vývoj od vajíčka po infekční larvy třetího stadia nastat během čtyř dnů. Pokud nejsou vhodné podmínky, je doba vývoje larev variabilnější. Nízká vlhkost a vysychání rychle zabíjejí vajíčka i larvy. Zapouzdřené larvy L3 si zachovávají kutikulu larev druhého stadia a jsou nejodolnější volně žijící formou, která je schopna přežít po dlouhou dobu,

pokud je teplota a vlhkost příznivé. Infekční larvy se pohybují z trusu na půdu. Poté náhodně migrují horizontálně a vertikálně nahoru travním porostem. Larvy se nijak neživí, pro přežití se spoléhají na uloženou energii. Tyto infekční larvy jsou konzumovány, když zvířata spásají pastvinu. Po požití ovlivní přežití a usazení larev ve slezu řada faktorů, které jsou odvozené od hostitelské ovce. Patří mezi ně věk, plemeno, zdraví a nutriční stav ovcí. Tyto faktory mohou významně ovlivnit schopnost jedince vyvolat imunitní reakce na larvy *H. contortus*. V ovci poté probíhá odlupování kutikuly. Když je toto po třech dnech dokončeno, je larva L4 dlouhá přibližně 5 mm. Přibližně desátý den se dostane larva z povrchu slezu do žaludečních jamek. Při tomto ději dochází ke krvácení, protože se larvy do žaludku dostávají pomocí lancety v jejich ústní dutině. Larvy L4 pak dozrávají do dospělých forem, které jsou sexuálně dimorfní. Dospělé samice *H. contortus* začínají produkovat vajíčka od 12. do 15. dne, která se vylučují s trusem. Zde končí cyklus a navazuje na něj další nový [86].



Obrázek 13 Cyklus vlasovky slezové. Převzato z [88].

Problémem je vznik rezistence vlasovky slezové vůči anthelmintikům. Proto je třeba obezřetnost při používání anthelminetik, aby se zabránilo dalšímu rozvoji rezistence [85]. Problém rezistence by se mohl úspěšně vyřešit vakcinací, čemuž se v těchto letech věnuje velká pozornost. Zatím prokazuje největší účinnost DNA vakcína. Vakcíny jsou slibnou kontrolní strategií proti parazitům. Nicméně rozsáhlé genetické variace a imunoregulační charakteristiky parazitů zjevně brání vývoji vakcíny. Imunitní reakce na hlístové parazity v jejich hostiteli jsou poměrně složité a charakterizované do dvou různých fází. První fází je imunitní reakce na infekční larvy a druhou fází je imunitní reakce proti dospělým parazitům. V posledních letech se na ovcích testuje převážně vakcína Barbervax [84, 89], nicméně její příprava i podávání je velice náročné a účinné pouze u jehňat. V současné době s množstvím dostupných genomických a transkriptomických dat a nástrojů pro úpravu genomu CRISPR-Cas se mohou tvořit vylepšené alternativní strategie při vývoji vakcíny proti vlasovce slezové [84].



Obrázek 14 Vajíčka vlasovky slezové. Převzato z [84].

Hemonchóza je zároveň jedním z onemocnění, které může přispívat ke vzniku anemie u ovcí. Je obecně uznávána jako jedna z nejvýznamnějších příčin anémie u malých přežvýkavců všech věkových kategorií v mnoha zemích po celém světě. Anemie se vyznačuje bledostí sliznic, která je snadno viditelná na spojivce ovce [90]. Anemii můžeme zaznamenat od 10. až 12. dne od nákazy zvířete parazitem [91]. Ke vzniku anemie u ovcí však může přispět řada dalších faktorů [86]. Dalším příznakem onemocnění hemonchózou je obecné chřadnutí organismu, eozinofilii, lymfocytóza, hypoproteinémie, s tím související bledost sliznic, snížená

produkcí vlny, podčelistní edémem, až tyto faktory mohou vyústit v smrt zvířete. Tyto příznaky souvisí s tím, že parazit saje hostiteli krev. Jeden červ dokáže pojmout za den až 50 μ l krve [87], celkově tak může docházet ke ztrátám 200 ml až 600 ml krve za den [84].



Obrázek 15 Vlasovka slezová. Převzato z FAF UK KBV.



Obrázek 16 Samec vlasovky slezové. Převzato z FAF UK KBV.



Obrázek 17 Samice vlasovky slezové. Převzato z FAF UK KBV.

V žaludeční stěně nemocného zvířete můžeme snadno najít kulaté červy o velikosti 2 cm (Obrázek 15) [87]. Samec (Obrázek 16) dosahuje délky cca 1,7 cm a šířky těla cca 0,3 mm. Na konci těla má bursu, která se skládá ze tří laloků. Samičky (Obrázek 17) mají okolo vaječnicků spirálovitě stočené červené střevo, které je snadno viditelné i pouhým okem a je to jeden z hlavních rozeznávacích znaků mezi samcem a samicí. Červená barva střeva je způsobena krví, konkrétně hemoglobinem hostitele [90]. Samička dosahuje délky cca 2,7 cm a šířky cca 0,6 mm. Kromě výrazného střeva má také vulvu, která se nachází na zadní třetině těla a je ve vzdálenosti cca 0,4 mm od konce těla. Vulvu lze spatřit pod mikroskopem. Těla samic i samců jsou nitkovitá, hladká a povrch těla pokrývá kutikula [92].

4. Úprava biologického materiálu před chromatografickou analýzou

Před chromatografickou analýzou je vhodné vzorek upravit co nejvhodněji pro dané měření. Vzorky jsou ve většině případů ve formě směsi, proto je vhodné některé ze separačních technik pro oddělení námi analyzovaných látek. Pokud pracujeme s biologickými vzorky, často pro se separaci analytu využívá precipitace proteinů. Existují různé druhy proteinové precipitace jako je například precipitace proteinu mísitelným organickým rozpouštědlem, extrakce, srážení solemi, změnou pH nebo teplotou. Proteiny mají na povrchu solvatační obal, který významně ovlivňuje rozpustnost dané molekuly ve vodě. Solvatační obal se skládá z vody a iontů a funguje na principu elektrostatických sil mezi polárními strukturami proteinů a dipóly vody [93, 94].

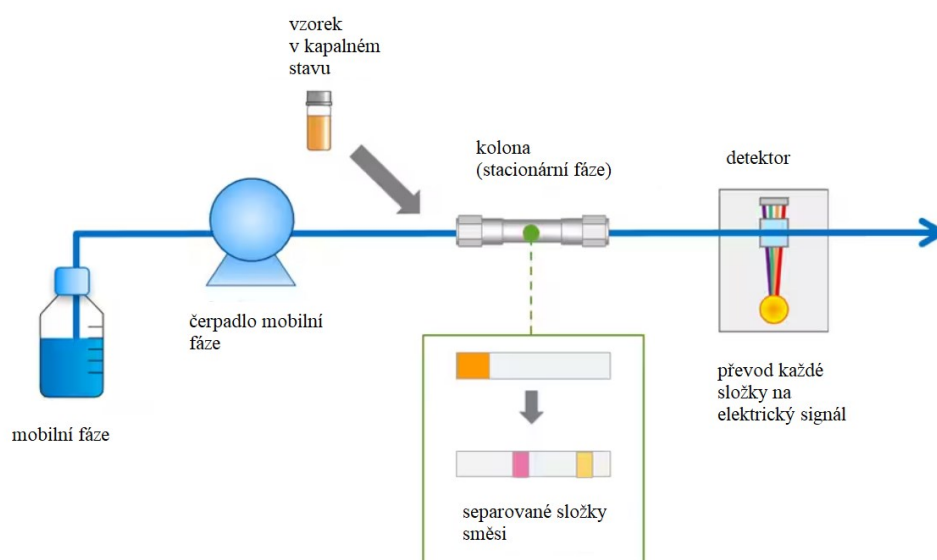
Pro analýzu vzorku chromatograficky se velmi využívá precipitace proteinů organickým rozpouštědlem mísitelným s vodou jako je acetonitril, methanol nebo aceton, v určitých případech lze použít i ethanol. Velmi vhodná je tato metoda pro kapalinovou chromatografii v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Tato metoda je často aplikována ve farmakokinetice. Při této precipitaci se využívá schopnosti rozdílné rozpustnosti ve vodě a v organických rozpouštědlech. Koncentrace rozpouštědla je nepřímo úměrná velikosti solvatačního obalu molekuly, tedy čím vyšší je koncentrace organického rozpouštědla, tím menší velikost solvatačního obalu molekuly. Organické rozpouštědlo postupně vytlačuje vodu z povrchu proteinu a váže ji v hydratačních vrstvách kolem molekul organického rozpouštědla. Organická rozpouštědla mísitelná s vodou mají schopnost snižovat dielektrickou konstantu vody, díky čemuž se snáze dva proteiny přiblíží směrem k sobě. Postupně tak dojde k absenci solvatačního obalu a vysrážení proteinů. Součástí této metody je centrifugace, která slouží k oddělení výsledných proteinových sraženin od analytu. Po odstředění vzorku zůstane na dně zkumavky pevná usazená část zvaná precipitát. Nad precipitátem se nachází čirá kapalná část, která se nazývá supernatant. V tomto experimentu byl použit acetonitril. Výhoda acetonitrilu oproti methanolu je jeho efektivnější precipitace. Methanol vysráží proteiny ve formě vloček, což často není pro experiment žádoucí [93, 94, 95].

5. Metody vhodné pro měření vzorků

5. 1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High – Performance Liquid Chromatography) je jednou z nejpobulárnějších technik chromatografie [96]. Zásahu na oblíbenosti této metody má především fakt, že se jedná o levnou a poměrně jednoduchou metodu, navíc obsluha je snadno ovladatelná a celá metoda je velmi spolehlivá [97]. HPLC je moderní, výkonná a všestranná chromatografická separační technika. Běžně ji lze využít k separaci, identifikaci a kvantifikaci složek z komplexních směsí. Při standardní HPLC analýze je průměr kolony obvykle 2,0–4,6 mm a její délka dosahuje 20–250 mm. Kolona je uvnitř vyplněna stacionární fází, nejčastěji se můžeme setkat s modifikovaným silikagelem s oktadecylovým ligandem tzv. C18, kdy se velikost částic pohybuje v rozmezí 2–5 μm . HPLC je pravděpodobně nejrozšířenější analytickou separační technikou pro kvalitativní a kvantitativní stanovení sloučenin v bioanalytických produktech [96].

Analýzu vzorků zajišťuje kapalinový chromatograf, který se skládá z několika částí. Na začátku tohoto přístroje se nachází zásobník na mobilní fázi, která je dávkována a transportována pumpou, což je vysokotlaké čerpadlo. Některé přístroje HPLC mají více zásobních míst pro mobilní fázi, proto HPLC obsahuje také směšovač pro mobilní fáze. V případě gradientové eluce se používají dvě vysokotlaká čerpadla a směšovač, který, se vyskytuje až za těmito čerpadly, to ovšem záleží na typu pumpy. Důležité je také mobilní fázi odplynit, aby se zamezilo vzniku bublin, a proto tento účel obsahuje HPLC komponentu vakuový odplyňovač. V dávkovacím zařízení poté dojde k nastříkovaní vzorku o námi zvoleném objemu. Vzorek poté putuje do předkolony a na koloně dochází k separaci. Analyty jsou detekovány pomocí detektoru umístěný za kolonou. Celá sestava je operována skrze počítač s programem, který vyhodnotí dané analyty [98, 99]. Sestava HPLC je přehledně shrnuta na Obrázku 18.



Obrázek 18 Komponenty HPLC. Převzato a upraveno z [100].

Detekce HPLC je založena na principu UV absorbance, fluorescence, indexu lomu, chemiluminiscence a různých typech elektrochemické detekce, což je důvod všestranného využití této metody [101]. Nejčastěji používaným detektorem spojeným s HPLC systémem je UV nebo PDA detektor. Často se používají i další techniky nebo kombinace technik společně s HPLC. Například hmotnostní spektrometrie (MS) nebo nukleární magnetická rezonance (NMR). Tyto techniky a jejich kombinace se stala zcela běžnými metodami a díky tomu se zvýšila schopnost separace a řešení strukturálních problémů analyzovaných látek. Někdy se používá více detekčních technik, například LC-UV-MS, LC-MS-MS a LC-NMR-MS [96].

5. 2. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, Mass Spectrometry) se běžně využívá ve studiu proteinů a dalších molekul, v chemické analýze a pro potřebu charakterizace biologických vzorků. Má velmi široké využití odvětví životního prostředí, veterinární sféře, v lékařství, průmyslu, forenzní analýze, zemědělství, toxikologii, genetice, molekulární genetice nebo v laboratořích v potravinářství. Princip této metody spočívá ve vzájemném působení nabitých částic s magnetickým nebo elektrickým polem ve vakuu. Hmotnostní spektrometrie je versatilní metoda a lze ji použít pro širokou paletu molekul, jednou z hlavních podmínek je že látka musí být ionizovatelná. Můžeme sledovat například peptidy, lipidy, metabolity nebo glykany, a to v jediném experimentu. Princip spočívá v ionizaci molekul vzorku a poté vygenerování hmotnostních spekter. Ionizací vzniknou ionizované molekuly vzorku, které mohou v iontovém

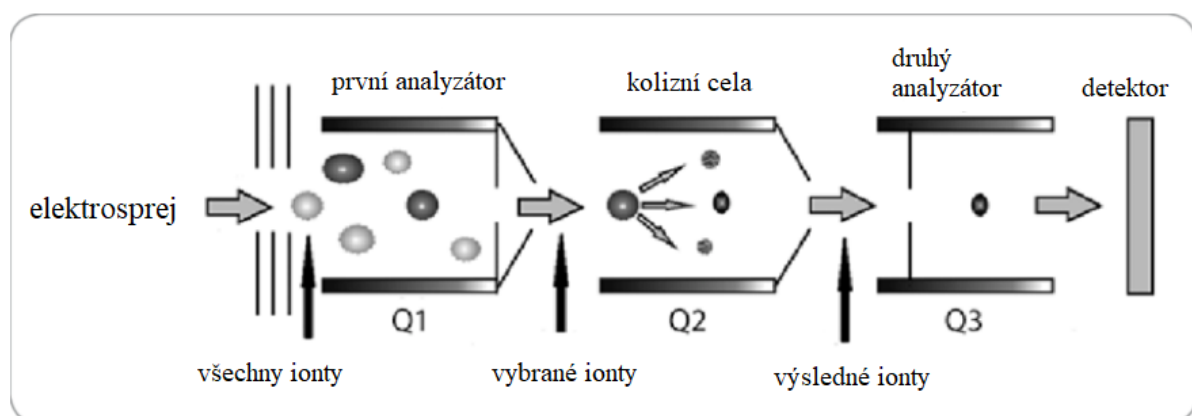
zdroji fragmentovat. Částice jsou separovány podle poměru hmotnost/náboj nabitých částic (m/z). U těchto iontů se po dopadu na detektor určí jejich počet. Často se využívá tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), kdy se propojí více hmotnostních spektrometrů za účelem zvýšení citlivosti metody. Velmi důležité pro analýzu je co nejpřesnější zpracování vzorku, protože i malé množství kontaminace nebo nedostatečné zpracování vzorku může velice snadno ovlivnit výsledek. Důležité jsou také další parametry jako je například inhibovat enzymovou aktivitu, ovšem to závisí na daném vzorku, zda je to třeba. Díky svojí široké škále aplikací se hmotnostní spektrometrie velice rozšířila v oblasti výzkumu a také v klinické oblasti [102, 103, 104].

Hmotnostní spektrometr má tři hlavní části, a to zdroj iontů, analyzátor a detektor. Z ionizačního zdroje přechází částice do urychlovače a poté do separátoru. V iontovém zdroji vznikají ze vzorku ionty v plynné fázi. Iontové zdroje se dělí na měkké a tvrdé na základě množství energie při ionizaci. Při měkké ionizaci dochází k menšímu množství fragmentů oproti ionizaci tvrdé. V bioanalýze se velmi často využívá měkká ionizační technika, a to elektrosprej ESI (electro spray ionization). ESI je univerzální šetrná metoda ionizace, která probíhá za atmosférického tlaku díky vlivu vysokého elektrického napětí na kapiláru. Vznikají malé kapičky aerosolu, které jsou postupně odpařovány a dále převedeny do analyzátoru. Tato ionizační technika je vhodná v případě středně až silně polárních analytů, malých organických a anorganických molekul, ale i velkých biomolekul a polymerů. V kombinaci s HPLC nebo HPLC-MS se nejčastěji využívá ionizace pomocí ESI stejně jako v případě této práce [103, 104, 110].

Analyzátoři se používají pro separaci iontů podle velikost m/z a dále přenáší analyt do detektoru. Existuje několik typů analyzátorů například magnetický analyzátor, kvadrupólový analyzátor, iontová past, iontově cyklotronová rezonance, orbitální past nebo analyzátor doby letu (TOF). Analyzátoři lze také rozdělit dle jejich rozlišovací schopnosti na analyzátoři s vysokou nebo nízkou rozlišovací schopností. Volba analyzátoru závisí právě na rozlišovací schopnosti, typu vzorku a obecně na požadavcích na danou analýzu vzorku jako je rychlost analýzy, citlivost nebo účinnost [98, 99, 103, 104].

V analýze je velmi používán kvadrupólový analyzátor, který je sestaven ze čtyř kovových tyčí uspořádané do tvaru kruhu. Dvě tyče naproti sobě jsou spojeny střídáním stejnosměrného a střídavého napětí. Tím dochází k oscilaci iontů. Ionty jsou poté separovány na základě určité velikosti iontů v poměru m/z , protože pouze vybrané ionty budou mít v daném

okamžiku stabilní letovou dráhu. A právě tyto ionty putují dále do detektoru. Jedním z nejčastěji používaných analyzátorů je trojitý kvadrupól, a to díky jeho schopnostem jako je vysoká citlivost, rychlost a univerzálnost. Jeho nevýhodou může být jeho nižší rozlišení. Komponenty trojitého kvadrupólu jsou na schématu na Obrázku 19. Vyskytují se zde tři kvadrupóly, kdy dva slouží jako hmotnostní analyzátoři a mezi nimi je třetí, který slouží jako kolizní cela. V prvním analyzátoru se selektují ionty. V kolizní cele dochází ke srážkám iontů z prvního kvadrupólu s molekulami plynu. Jako kolizní plyn se používá dusík nebo argon. Díky srážkám se zvýší vnitřní energie a částice mohou fragmentovat. Fragmenty putují dál do třetího kvadrupólu, kde jsou ionty analyzovány. Tento princip je zobrazen na obrázku 19. Trojitý kvadrupól může fungovat ve čtyřech režimech, a jsou to sken produktových iontů, sken prekurzorových iontů, sken neutrální ztráty a záznam vybraných reakcí (MRM, Multiple reaction monitoring). MRM je velmi citlivý a selektivní režim. Jeho výhodou je rychlost měření hmotnostního přechodu, což je přechod hodnot m/z prekurzorových a produktových iontů. Rychlost přechodu je 5-200 m/s. MRM byl používán i v rámci této práce [98, 99, 103, 104].



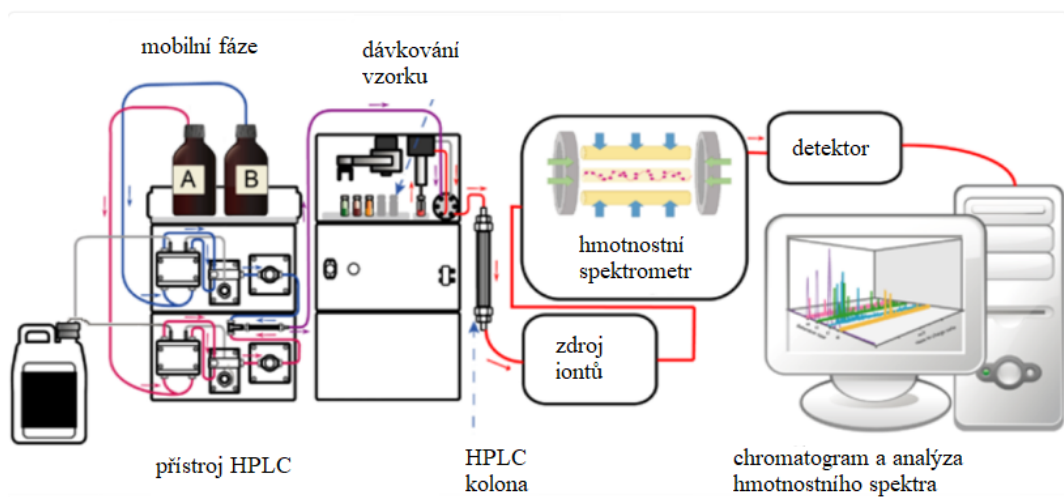
Obrázek 19 Trojitý kvadrupól u MS. Převzato a upraveno z [105].

Z analyzátoru putují ionty na detektor a signál je poté převeden do digitálního formátu. Výstupem je záznam dat ve formě hmotnostního spektra zachycující intenzitu signálu. Tyto informace jsou poté porovnávány se spektry známých látek. Analýza i detekce látek probíhá ve vakuu. Detektory lze rozdělit do dvou skupin. První skupina detektorů zaznamenává všechny ionty na základě m/z , které zaznamenávají přímo hodnotu elektrického proudu. Druhá skupina zaznamenává ionty ve vztahu k velikosti m/z . Pro detekci se u MS používá většinou elektronový násobič nebo scintilační krystal [98, 103].

5. 3. HPLC-MS

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií se dá považovat za jednu z nejcitlivějších analytických metod [103]. HPLC–MS může poskytovat kvalitativní a kvantitativní informace ohledně různorodých typů vzorků. Především za posledních deset let si tato metoda získala velikou oblibu [106]. Systém HPLC-MS je popsán na obrázku 20.

Jak již zde bylo zmíněno pro ještě větší rozlišovací schopnosti a citlivost je velmi vhodné a běžné použití spojení HPLC a MS. Nejčastěji je metoda HPLC-MS založena na principu ionizace za atmosférického tlaku jako je ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a foto ionizace za atmosférického tlaku (APPI) [101].



Obrázek 20 HPLC-MS. Převzato a upraveno z [107].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. Použité chemikálie, přístroje, příslušenství

6. 1. Chemikálie

- Flubendazol Sigma-Aldrich
- NADPH Roth
- Cytosol ISE
- Cytosol IRE
- Na-fosfátový pufr pH 7,4 100 mmol/l
- DMSO Penta
- Redestilovaná voda
- Kyselina glycerhetinová Sigma-Aldrich
- Naringenin Sigma-Aldrich
- Silybin Sigma-Aldrich
- Luteolin Sigma-Aldrich
- Glyceraldehyd Sigma-Aldrich
- Menadion Sigma-Aldrich
- Mebendazol Sigma-Aldrich
- Acetonitril Lach:ner
- Fubendazol deuterovaný Sigma-Aldrich

6. 2. Přístroje

- Mrazicí box s teplotou -80 °C Liebherr
- Thermomix comfort Eppendorf
- Vortex V-1 PLUS BIOSAN
- Analytické váhy Sartorius
- Centrifuga Thermo Scientific Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge
- Koncentrátor Eppendorf Concentrator Plus
- Ultracentrifuga Sorvall XW 80
- Homogenizátor Biobase MG-24
- Kapalinový chromatograf UHPLC Shimadzu Nexera
- Hmotnostní spektrometr Shimadzu 8030 Triple Quadrupol

6. 3. Další příslušenství

- Pipety Eppendorf 1 μl – 1000 μl
- Špičky Eppendorf 10 μl – 1000 μl
- Zkumavky 1,5 ml Eppendorf
- Navažovací lžička
- Kádinky
- Nádoba na led
- Led
- Vialky 2 ml
- Popisovač
- Štítky na vzorky
- Krabička na ukládání vzorků
- Filtr LUT Syringe Filter PTFE 4 mm, 0,22 μm
- Centrifugační kyvety
- Míchadlo
- Pinzeta
- Nůžky

7. Přípravy roztoků

7. 1. Příprava 0,1 M Na-fosfátového pufru pH 7,4

Byl připraven roztok A smícháním 3,5 g hydrogen fosforečnanu sodného a 100 redestilované vody. Poté byl připraven roztok B smícháním 2,7 g dihydrogen fosforečnanu sodného a 100 ml redestilované vody. Výsledný pufr byl vytvořen smícháním 40,5 ml roztoku A a 9,5 ml roztoku B. Pufr byl změřen pH metrem, aby se ověřilo pH 7,4. Tento výsledný pufr byl uchováván v lednici.

7. 2. Příprava flubendazolu, inhibitorů, NADPH

7. 2. 1 Příprava NADPH

Příprava NADPH probíhala vždy těsně před experimentem. Vytvořený roztok NADPH musel být uchováván, v mezičase ihned po jeho vytvoření a těsně před jeho použitím v experimentu, na ledu.

Postup:

Bylo potřeba vypočítat dané množství NADPH pro experiment daný den, toto množství bylo měněno na základě počtu vzorků daný den. Konečná koncentrace NADPH byla vždy 10 mmol/l. Výpočet viz níže. Poté byla navážka rozpuštěna v redestilované vodě. Roztok NADPH byl ponechány vždy na ledu.

Výpočet:

$$\text{Celková koncentrace roztoku NADPH (c}_1\text{)} = 10 \text{ mmol/l} = 0,01 \text{ mol/l}$$

$$\text{Molární hmotnost NADPH (M}_{\text{NADPH}}\text{)} = 744,413 \text{ g/mol}$$

$$\text{Celkový objem roztoku NADPH (V}_{\text{NADPH}}\text{)} = 600 \text{ }\mu\text{l} = 0,0006 \text{ l}$$

$$m = c \cdot V \cdot M$$

$$m = 0,01 \cdot 0,0006 \cdot 744,413$$

$$m = 0,0044665 \text{ g} = \underline{4,4665 \text{ mg}}$$

Pro 39 vzorků bylo naváženo 4,4665 mg NADPH a rozpuštěno v 600 μl redestilované vody.

7. 2. 2. Příprava inhibitorů

Všechny inhibitory byly v podobě jemného prášku rozpuštěny v DMSO, pouze menadion byl rozpuštěn v ethanolu. Inhibitory byly uchovávány v lednici jak v jejich původním stavu a balení, tak poté v roztoku. Výsledná koncentrace všech inhibitorů byla 1 mmol/l. Navážky inhibitorů byly vždycky vypočítány podle vzorového příkladu jako u kyseliny glycerhetinové viz níže.

Výpočet kyselina glycerhetinová:

Celková koncentrace roztoku inhibitoru (c) = 1 mmol/l = 0,001 mol/l

Molární hmotnost inhibitoru ($M_{\text{Kys.glyc.}}$) = 470,69 g/mol

Celkový objem roztoku inhibitoru ($V_{\text{kys.glyc.}}$) = 1 ml = 0,001 l

$$m = c \cdot V \cdot M$$

$$m = 0,001 \cdot 0,001 \cdot 470,69$$

$$m = 0,00047069\text{g} = \underline{0,47069 \text{ mg}}$$

Inhibitor kyselina glycerhetinová o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 4,7069 mg v 10 ml DMSO.

Inhibitor naringenin o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 2,7226 mg v 10 ml DMSO.

Inhibitor silybin o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 4,8244 mg v 10 ml DMSO.

Inhibitor luteolin o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 3,4349 mg v 12 ml DMSO.

Inhibitor glyceraldehyd o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 1,8016 mg v 20 ml DMSO.

Inhibitor menadion o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 2,0662 mg v 12 ml v ethanolu.

Inhibitor mebendazol o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 2,95293 mg v 10 ml DMSO.

7. 2. 3. Příprava flubendazolu

Výpočet flubendazol:

Celková koncentrace roztoku flubendazolu (c) = 1 mmol/l = 0,001 mol/l

Molární hmotnost flubendazolu ($M_{\text{flubendazol}}$) = 313,28 g/mol

Celkový objem roztoku inhibitoru ($V_{\text{flubendazol}}$) = 10 ml = 0,01 l

$$m = c \cdot V \cdot M$$

$$m = 0,001 \cdot 0,01 \cdot 313,28$$

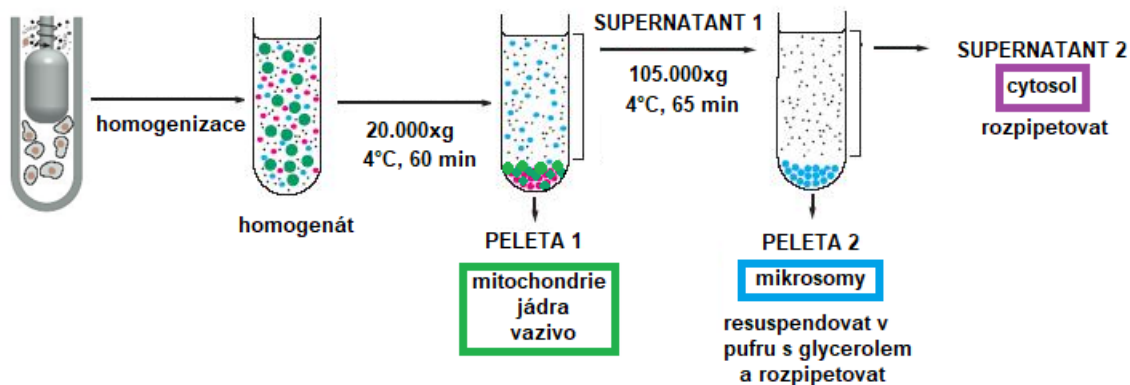
$$m = 0,0031328 \text{ g} = \underline{3,1328 \text{ mg}}$$

Flubendazol o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 3,1328 mg v 10 ml DMSO.

7. 3. Příprava subcelulárních frakcí cytosolu

Pomůcky viz (kapitola 6).

Vlasovka slezová uložená při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly rozvážena do misek po 5 g. Navážení parazitů byli dáni do homogonizátoru. K vlasovce slezové v homogonizátoru byl přilít 0,1 mol/l Na-fosfátový pufr pH 7,4 o objemu 30 ml na 5 g červů. Tato směs byla zhomogenizována v kuličkovém homogonizátoru 3 cykly 30 sekund. Zhomogenizovaný vzorek byl přemístěn do centrifugační kyvety. Vzorek byl odstředěn při 20 000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 60 minut. Po stočení byl odebrán supernatant do další centrifugační kyvety. Supernatant byl odstředěn při 105 000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 65 minut. Po tomto druhém odstředění byl opět odebrán supernatant v podobě cytosolu. Cytosol byl rozdělen do zkumavek po 0,16 ml a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Příprava subcelulárních frakcí cytosolu je zaznamenána na Obrázku 21.



Obrázek 21 Příprava cytosolu. Převzato z FAF UK KBV.

7. 4. Inhibiční experiment

Pomůcky viz (kapitola 6).

Vzorky s inhibitorem mebendazol byly připraveny o koncentraci 1 $\mu\text{mmol/l}$ a 2 $\mu\text{mmol/l}$, vzorky s ostatními inhibitory byly o koncentraci 1 $\mu\text{mmol/l}$ a 100 $\mu\text{mmol/l}$. Protein v cytosolu byl v reakci 0,4 mg/ml. Veškeré experimenty byly prováděny třikrát. Experimenty probíhaly od září 2022 do dubna 2023.

Postup:

Bylo třeba pracovat co nejrychleji a nejpřesněji s ohledem na to, že se jednalo o manipulaci s enzymovým preparátem. Byl připraven roztok NADPH o koncentraci 10 mmol/l, jak je již zmíněno výše. Byla připravena nádoba s ledem, do které byly dány inhibitory, pufr, flubendazol a NADPH. Do zkumavek o objemu 1,5 ml byly pipetovány komponenty dle tabulky č. 10. Vzorky byly připraveny v technických triplikátech. Přehled vzorků je sepsán v Tabulce 10.

Tabulka 10 Přehled složek vzorků

Typ vzorku	Flubendazol 1 mmol/l [μl]	NADPH 10 mmol/l [μl]	Pufr [μl]	DMSO [μl]	Inhibitor 1 mmol/l [μl]	Cytosol [μl]
FLU bez inhibitoru	1	10	39	1	-	50
FLU s inhibitorem 10 μmol/l	1	10	38	-	1	50
FLU s inhibitorem 100 μmol/l	1	10	29	-	10	50
Bez cytosolu	1	10	88	-	1	-
Bez FLU	-	10	39	-	1	50

Všechny vzorky byly dány do termostatu. Reakce byla odstartována přidavkem 50 μl cytosolu. Po přidání cytosolu byly zkumavky inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 4 hodiny. Poté bylo do každého vzorku přidáno 300 μl studeného acetonitrilu a 1 μl vnitřního standardu FLU-D3 o koncentraci 1 mmol/l, který slouží pro porovnání s odezvou analytu. Vzorky byly odstředěny při 20 000 g a 4 °C po dobu 10 minut. Z odstředěných vzorků bylo odebráno 350 μl do vialky. Vzorky ve vialkách byly vysušeny při teplotě 30 °C po dobu 2 hodin a až do měření uchovávány při -20 °C.

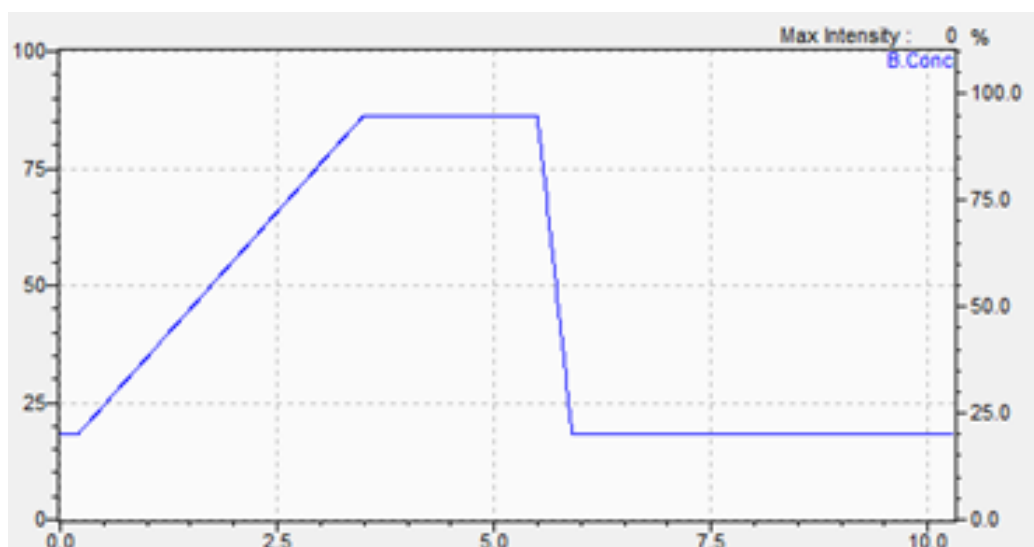
7. 5. Rozpouštění a měření vzorku

Do jednotlivých vzorků bylo přidáno 30 μl ACN, aby byl vzorek kompletně rozpuštěn. Poté bylo přidáno 70 μl redestilované vody. Tento objem 100 μl 30 % acetonitrilu smísený se vzorkem byl přepipetován do injekční stříkačky o objemu 1 ml. Na injekční stříkačku byl nasazen PTFE filtr o průměru 0,22 μm. Obsah injekční stříkačky, tedy vzorek rozpuštěný v 30 % ACN, byl přefiltrován do inzertu v původní vialce. Takto byly rozpuštěny všechny vzorky. Vzorky byly změřeny pomocí LC-MS (kapitola 7.6).

7. 6. Parametry pro měření vzorků pomocí metody HPLC-MS

Po rozpuštění vzorků byla uskutečněna samotná HPLC-MS analýza. Vzorky byly analyzovány na chromatografu Shimadzu Nexera. Separace analytů probíhala na koloně Zorbax Bonus RP C18, o rozměrech 2,1 mm x 150 mm a průměru částic 1,8 μm . Tato stacionární fáze je vhodná pro separaci bazických analytů. Chromatograf obsahuje binární pumpu, vakuový odplyňovač, automatický dávkovač s teplotou 15 $^{\circ}\text{C}$ a prostor pro kolonu při stálé teplotě 50 $^{\circ}\text{C}$.

Vzorky byly měřeny při gradientové eluci, a to po dobu 10 minut. Mobilní fáze byla složena ze dvou roztoků. Mobilní fáze A měla složení 0,1 % HCOOH. Mobilní fáze B měla složení ACN s obsahem 0,1 % HCOOH. Mobilní fáze měla průtok 0,4 ml/min. Gradientová eluce probíhala v následujících krocích: složení mobilní fáze bylo nastaveno na 20% mobilní fáze B, a to po dobu 20 vteřin. V následujících 3 minutách se procentuální zastoupení mobilní fáze B měnilo na 95 %. Mobilní fáze B při hodnotě 95 % byla stálá po dobu 2 minut. Poté se hodnota mobilní fáze B opět snížila na 20 %. 6 minut od konce analýzy již byla tato hodnota konstantní. Záznam gradientové eluce probíhal podle záznamu na Obrázku 22.



Obrázek 22 Záznam gradientové eluce

Pro detekci byla využita ionizační technika ESI v pozitivním iontovém režimu. Jako sušící a nebulizační plyn byl použit dusík s průtokem sušícího plynu 12 l/min a s průtokem nebulizačního plynu 2,5 l/min. Napětí na kapiláře dosahovalo hodnoty 4,5 kV při teplotě tepelného bloku 400 $^{\circ}\text{C}$. Pro měření vzorků byl použit analyzátor QqQ v režimu MRM.

Kolizním plynem ve Q2 byl argon. Pro analýzu vzorků byl použit spektrometr Shimadzu LCMS 8030. Dávkovaný objem vzorku byl 1 μ l.

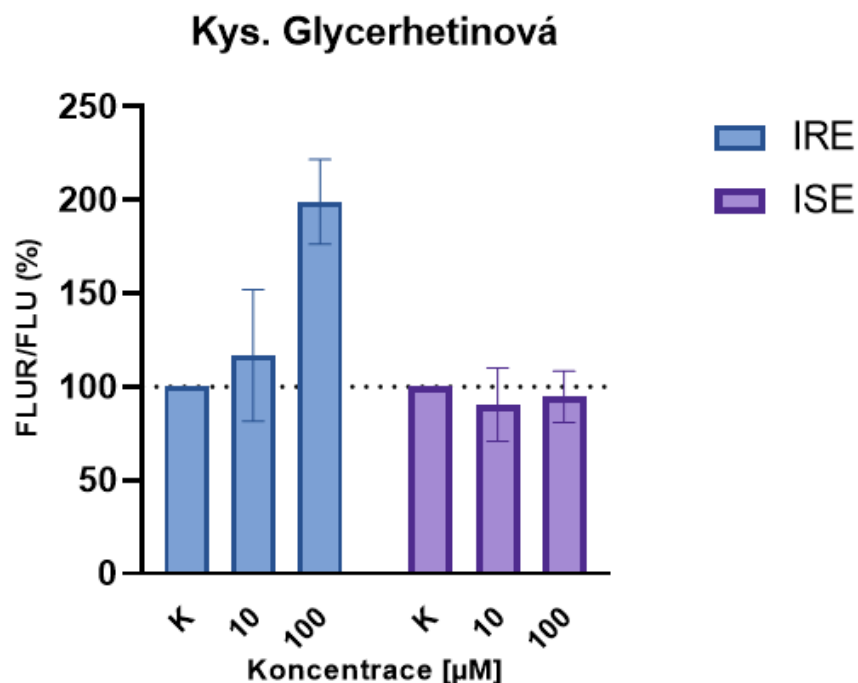
7. 7. Vyhodnocení dat

Celý experiment byl opakován třikrát a jednotlivé vzorky byly vždy připravovány v triplikátech. Data získané z UHPLC-MS analýzy představovaly plochy pod píkem FLU a FLUR vztažené k plochám pod píkem IS. Výsledná data byla vyhodnocena jako poměr ploch pod píkem pro FLU-R ku FLU. Statistické vyhodnocení probíhalo v programu GraphPad Prism 9 a byl aplikován test dvoucestná analýza rozptylu ANOVA s post-hoc Tukey testem.

8. Výsledky

Každý inhibitor je popsán jedním grafem, ve kterém je na ose x vynesena koncentrace inhibitoru v $\mu\text{mol/l}$ a na ose y se nachází poměr hodnot velikostí ploch pod píkem redukovaného flubendazolu a flubendazolu v procentech. Osa y tedy vyjadřuje inhibici enzymu v cytosolu daným inhibitorem, což odpovídá sníženému množství tvorby redukovaného FLU vztaženému k FLU v procentech. Na ose x je nejprve zobrazena kontrola, poté vzorky s koncentrací 10 $\mu\text{mol/l}$, a nakonec vzorky s koncentrací 100 $\mu\text{mol/l}$. Hodnota kontroly vždy dosahuje hodnoty 100 % a je v grafu vyznačena přerušovanou linkou. S touto hodnotou kontroly je vždy porovnávávané množství FLU-R/FLU. V jednom grafu jsou zároveň zobrazeny výsledky obou kmenů IRE a ISE vedle sebe pro přehlednější porovnání. Ke každé koncentraci inhibitoru je v grafu znázorněna směrodatná odchylka. Inhibitory byly vybírány na základě předchozích zkušeností na katedře biochemických věd FaF UK HK ze studia inhibice redukujících enzymů v různých modelových systémech. V případě inhibice redukce by v přítomnosti inhibitoru měl být pozorován pokles tvorby FLU-R/FLU. V případě koncentrační závislosti míry inhibice čím vyšší byla použitá koncentrace inhibitoru v reakční směsi, tím menší množství FLU-R/FLU by mělo být detekováno. Grafy s výsledným vyhodnocením jsou zobrazeny na Obrázcích 23–29.

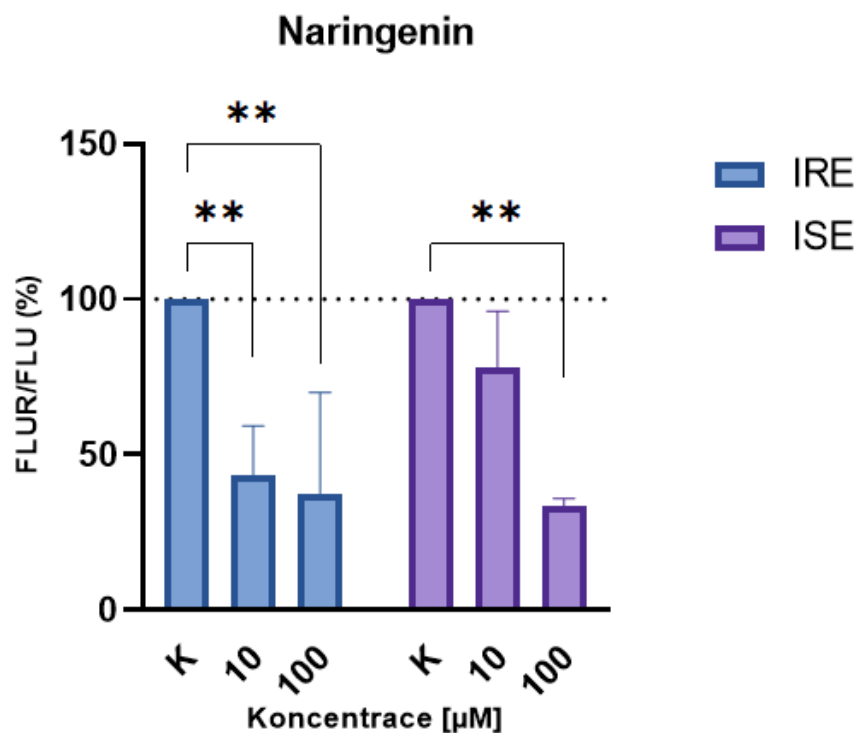
8. 1. Vyhodnocení kyseliny glycerhetinové



Obrázek 23 Inhibice FLU kyselinou glycerhetinovou

Z grafu lze vypořadovat, že kyselina glycerhetinová nevykazuje inhibiční účinky při tvorbě FLU-R. U vzorků IRE naopak při vyšší koncentraci roste množství FLU-R ve vzorku, což je opačný děj, než který byl očekáván. Při koncentraci 10 µmol/l dosahuje hodnota FLU-R/FLU 120 % a koncentrace 100 µmol/l dosahuje téměř 200 %. Naměřené hodnoty FLU-R vůči FLU u ISE dosahují lehce pod hranici kontrolních hodnot. Inhibiční účinek kyseliny glycerhetinové o koncentraci 10 µmol/l je o 10 % nižší v porovnání s kontrolním vzorkem, nižší koncentrace nevykazuje inhibiční účinek téměř žádný. Statisticky významná inhibiční aktivita u tohoto inhibitoru tedy nebyla zaznamenána.

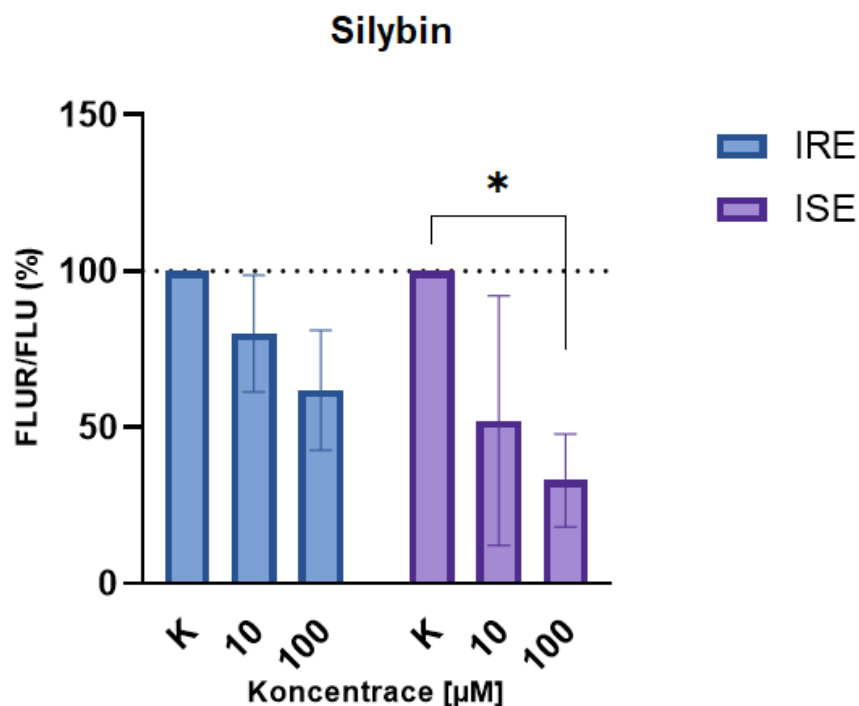
8. 2. Vyhodnocení naringeninů



Obrázek 24 Inhibice FLU naringeninem

Naringenin už inhibiční účinky na tvorbu FLU-R prokazuje. Tyto účinky jsou zesíleny při vyšší koncentraci inhibitoru. Největší míru inhibice můžeme pozorovat u tvorby FLU-R u kmene ISE s koncentrací naringeninů 100 μmol/l, která dosahuje hodnot 70 %. Při koncentraci naringeninů 10 μmol/l u ISE dochází ke vzniku FLU-R o 25 % méně než u kontrolního vzorku. U IRE je statisticky významné snížení pozorováno už i při nižší hladině inhibitoru, konkrétně 10 μmol/l naringenin způsobil 60 % inhibici tvorby FLU-R a 100 μmol/l způsobil 65 % inhibici tvorby FLU-R oproti kontrolním vzorkům.

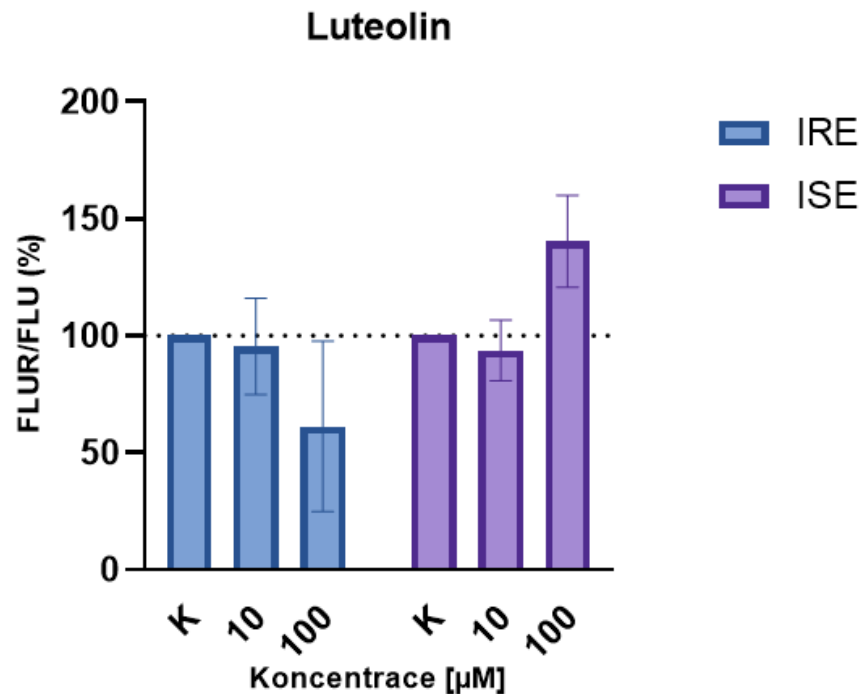
8. 3. Vyhodnocení silybinu



Obrázek 25 Inhibice FLU silybinem.

Silybin prokazuje inhibiční vliv na tvorbu FLU-R více u kmene ISE. K statisticky významné inhibici tvorby FLU-R/FLU docházelo pouze při koncentraci silybinu 100 µmol/l, kde inhibiční aktivita byla 70 % oproti kontrole. Při použití 100 µmol/l silybinu byla inhibice 50 %, ale kvůli velkým rozdílům mezi měřeními nebyla tato inhibice signifikantní. U kmene IRE nebyl pozorován signifikantní efekt inhibice, nicméně v obou koncentracích byla snižená tvorba FLU-R také pozorována; při koncentraci silybinu 10 µmol/l vzniklo 80 % FLU-R/FLU oproti kontrole a při 100 µmol/l silybinu vzniklo 60 % FLU-R/FLU oproti kontrole.

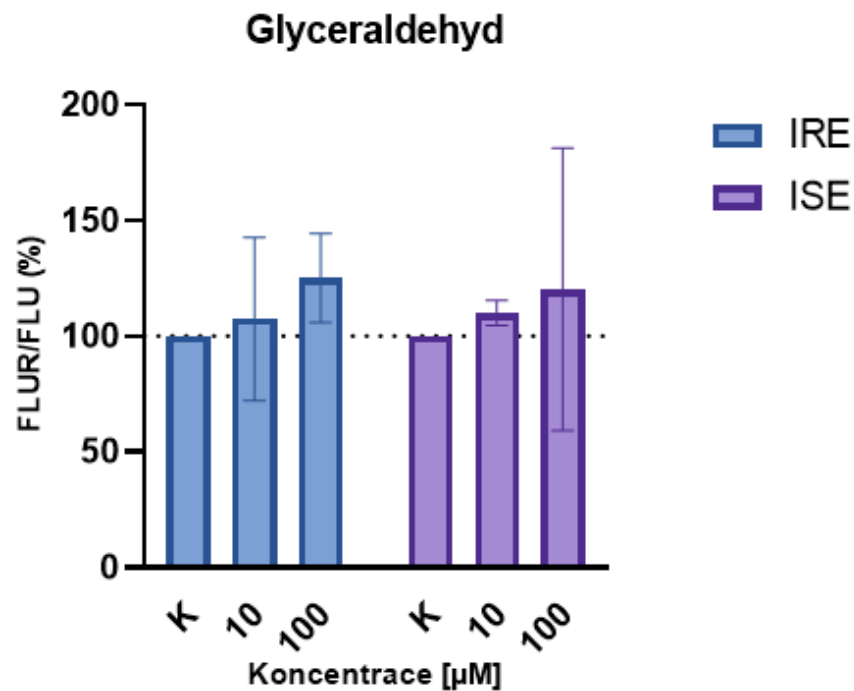
8. 4. Vyhodnocení luteolinu



Obrázek 26 Inhibice FLU luteolinem

U luteolinu vznikalo více FLU-R/FLU než u kontrolního vzorku, ale pouze u kmene ISE s koncentrací luteolinu 100 μmol/l. Tato hodnota přesahuje 135 % vzniklého FLU-R/FLU. U IRE byla zaznamenána inhibice FLU-R u koncentrace luteolinu 100 μmol/l, kdy hodnota vzniklého FLU-R/FLU dosahovala 60 % oproti kontrole. U kmene ISE nedošlo při koncentraci 10 μmol/l k významnému inhibičnímu efektu, oproti kontrole se jednalo o snížení tvorby FLU-R/FLU o cca 10 %.

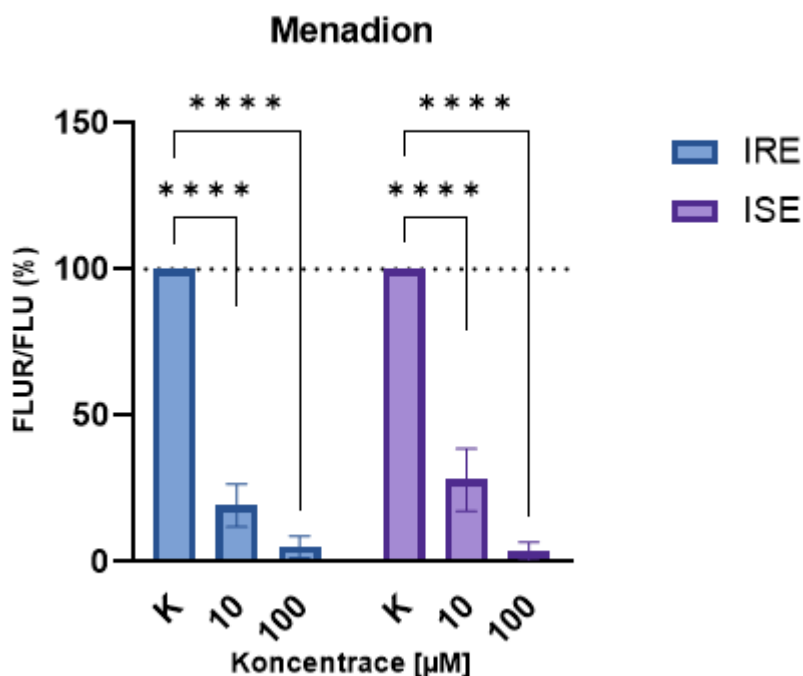
8. 5. Vyhodnocení glycerladehydu



Obrázek 27 Inhibice FLU glyceraldehydem

U glyceraldehydu nebyly zaznamenány žádné inhibiční účinky na tvorbu FLU-R. Naopak ve všech koncentracích a všech kmenech se s vyšší koncentrací glyceraldehydu zvyšovalo i množství redukovaného FLU, což je přesně opačný efekt, který by se od inhibitoru očekával. U obou kmenů ISE i IRE dosahují hodnoty vzniklého FLU-R/FLU při 10 $\mu\text{mol/l}$ okolo 110 % a u koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ se hodnoty vzniklého FLU-R/FLU pohybují na hranici 120 %. U glyceraldehydu nebyla detekována žádná míra inhibice reduktáz.

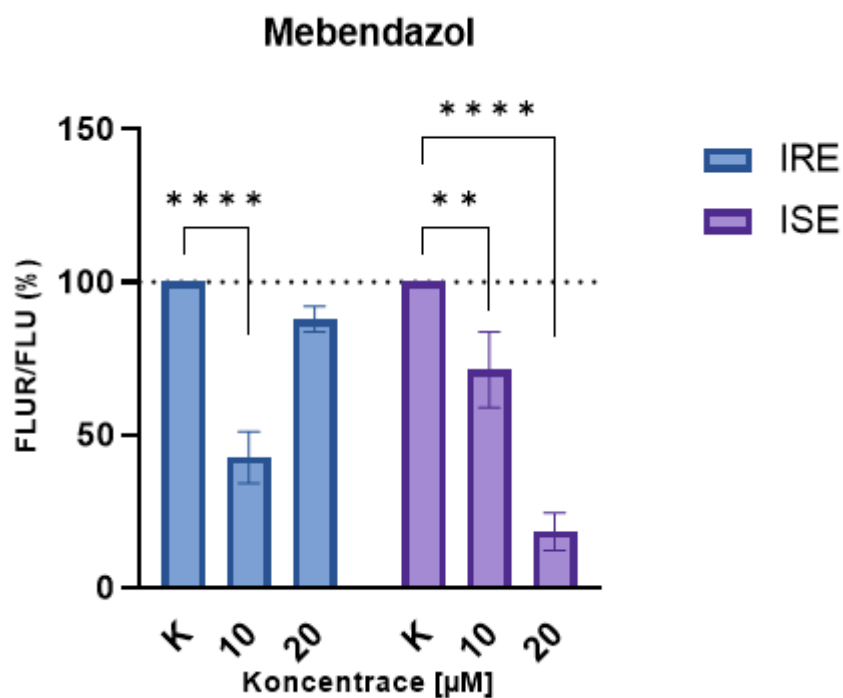
8. 6. Vyhodnocení menadionu



Obrázek 28 Inhibice FLU menadionem

Menadion prokázal největší inhibiční účinky vůči reduktázám a tvorbě FLU-R ze všech inhibitorů v této práci, a to v každém vzorku. Značné inhibiční vlastnosti menadionu se projevují již při koncentraci 10 µmol/l u kmene ISE, kdy je vznikající FLU redukován na 30 %. U kmene IRE bylo množství detekovaného FLU-R ještě nižší a dosahuje tak 20 % kontroly. S koncentrací 100 µmol/l inhibiční vliv opět roste, dochází téměř k potlačení redukce, a tím vzniku FLU-R. Platí zde, že čím vyšší koncentrace menadionu, tím více jsou cytosolové enzymy inhibovány, a tím méně vzniká FLU-R. Při koncentraci 100 µmol/l u IRE vzniká pouze 5 % FLU-R/FLU a u ISE vzniká pouze 3 % FLU-R/FLU oproti příslušným kontrolám. Jedná se tak o neúčinnější inhibitor v této práci.

8. 7. Vyhodnocení mebendazolu



Obrázek 29 Inhibice FLU mebendazolem

Mebendazol je strukturně podobný FLU, proto ho nelze v tomto experimentu považovat za inhibitor založený na stejném principu jako jsou inhibitory předchozí. Mebendazol je pravděpodobně redukován stejným enzymem jako FLU, proto mezi nimi vzniká kompetitivní vztah. Mebendazol by měl svojí podobností FLU vykazovat kompetitivní vlastnosti, což se potvrzuje u ISE, kdy s větší koncentrací dochází k vyšší inhibici. Musíme zde také zohlednit odlišnou koncentraci od ostatních inhibitorů z důvodu nižší rozpustnosti mebendazolu. U kmene IRE je při koncentraci 10 µmol/l je redukováno 60 % FLU, při použití 20 µmol/l mebendazolu je redukováno 15 % FLU v porovnání s kontrolou. U kmene ISE vykazuje mebendazol účinnou inhibici závislou na koncentraci, 10 µmol/l mebendazol snížil tvorbu FLU-R o 25 % a 20 µmol/l mebendazol dokonce o 80 %.

DISKUSE

Mezi nejběžnější střeční parazity, které člověka infikují, patří škrkavky, tasemnice, bičíkovci a měchovci. Střeční parazité mají vliv na zdraví svého hostitele a mohou mu způsobit např. anemii, potíže s močovým měchýřem, obecně způsobují zhoršený vývoj dětí, a to jak psychický, tak fyzický. A dále mohou způsobit komplikace během těhotenství, které se pak mohou přenést i na novorozence. Infekce helminty způsobují velkou komplikaci jak v oblasti veterinární, tak v oblasti lidské medicíny. Celkový průběh infekce a obecně její dopad na hostitele se může lišit dle druhu parazita. Zároveň počáteční kontakt mezi parazitem a hostitelem může být odlišný. Parazité mohou infikovat hostitele například požitím nedostatečně tepelně upraveného jídla, nebo prostřednictvím hmyzího vektoru anebo kontaminací infikovaného jídla například půdou. Hlístice mají složitý cyklus, kdy prochází určitými stádii. Z tohoto důvodu je také komplikovanější podávání anthelmintik a následná léčba [2]. I v dnešní době je infekce helminty u lidí velmi rozšířená a běžná, a to zejména v rozvojových zemích. Největší podíl na infekci lidí mají půdní parazité. Ideální prostředí pro tyto helminty je teplá a vlhká půda. Člověk se skrze půdu po její kontaminaci nakazí vajíčky nebo larvami parazitů [4]. Ve vyspělých zemích vede infekce k fatálním následkům jen velice zřídka [108]. Člověk infikovaný parazity je však citlivější k jiné nákaze, například kvasinkami. Zároveň nákaza parazity pacienta léčeného s HIV, AIDS, malárií nebo tuberkulózou může zhoršovat stav těchto chorob a u pacienta je zvýšeno riziko těžšího průběhu infekce [4]. V oblasti zemědělství působí parazitární infekce zvířat velké ekonomické ztráty po celém světě [109]. Parazitární infekce zvířat může způsobit špatnou reprodukční aktivitu zvířat, jejich pomalý růst a vývoj, sníženou produkci mléka a vlny, zhoršení kvality masa, nebo také vymírání stád [4].

Z důvodu pravidelného podávání anthelmintik celým stádům bez ohledu na míru infekce u jednotlivých zvířat či nestřídání anthelmintik se velmi rychle u většiny parazitů rozvíjí rezistence. Problematikou rezistence se zabývají vědecká pracoviště celosvětově, včetně katedry biochemických věd na FaF UK, kde byla tato práce uskutečněna. Na základě předchozích analýz bylo možné předem zvolit inhibitory reduktáz a jejich koncentraci, přítomnost v experimentu a koncentraci NADPH, na který se specializovaly studie [110, 111], dobu inkubace, a i zvolení daného anthelmintika, tedy FLU a jeho koncentraci. Těmto zvoleným faktorům též přispěla znalost mechanismu působení FLU ale také jeho biotransformace. Flubendazolu zahrnuje vazbu na β -tubuliny a následnou inhibici jejich polymerace, které vede k omezení jejich funkce a ke změnám na úrovni struktury mikrotubulů.

Jedním z mechanismů anthelmintické rezistence u hlístice vlasovky slezové je zvýšená biotransformace a eliminace anthelmintik z organismu hostitele. Hlavním biotransformačním mechanismem při eliminaci FLU je redukce karbonylové skupiny karbonyl-redukujícími enzymy. Karbonyl-redukující enzymy katalyzují první fázi biotransformace xenobiotik, a podílejí se tak na metabolismu léčiv. Z FLU vzniká redukcí karbonylové skupiny redukovaná forma flubendazolu (FLU-R). Výzkum metabolismu prokázal vyšší schopnost rezistentního kmene IRE vlasovky slezové redukovat flubendazol účinněji než u kmene ISE [112]. Předpokládáme, že jednou z možností, jak prodloužit a tím zefektivnit působení FLU by mohlo být použití inhibitorů reductáz. V této práci bylo testováno několik potenciálních inhibitorů reductáz dle přechozích analýz a též na základě této práce [113], konkrétně kyselina glycerhetinová, naringenin, silybin, luteolin, glyceraldehyd, menadion a mebendazol.

Nejmenší množství detekovaného FLU-R bylo zaznamenáno při použití inhibitoru menadionu. Platí zde, že čím vyšší koncentrace menadionu, tím více jsou cytosolové enzymy zodpovědné za redukci FLU inhibovány, a tím méně vzniká FLU-R. Při koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ u IRE bylo detekováno pouze 5 % FLU-R a u ISE pouze 3 % FLU-R. Při koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ u ISE bylo redukováno pouze 30 % FLU a při stejné koncentraci u IRE bylo redukováno 20 % FLU. Informace o tom, že menadion má na CBR inhibiční vliv dokazují i další studie jako je například [114]. V této studii byly hodnoceny koncentrace menadionu 10 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$ stejně jako v této práci. Ve studii [114] byly vyvozeny závěry podobně jako v naší studii týkající se vlasovky slezové ohledně potenciální inhibiční aktivity menadionu vůči lidským enzymům redukujících karbonylovou skupinu xenobiotika. Byla detekována vyšší inhibiční schopnost menadionu s jeho vyšší koncentrací stejně jako v této práci. Hodnoty při koncentraci menadionu 100 $\mu\text{mol/l}$ jsou skoro totožné s výsledky v této práci, neboť ve studii [114] byl zjištěn inhibiční účinek menadionu o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ 95,7 % a v našich experimentech byla tato hodnota stanovena na cca 95 % u kmene IRE a 97 % u kmene ISE. Menadion prokazuje inhibiční účinky vůči CBR, konkrétně SDR. Další inhibiční účinky menadionu vůči CBR potvrzuje studie [115], která se zabývá jaterním metabolismem FLU u ovcí. V této studii byly experimenty uskutečňovány v kratších časech oproti experimentům v této práci a zároveň byly použity rozdílné koncentrace, avšak i zde je zaznamenáno, že s vyšší koncentrací vykazuje menadion vyšší inhibiční aktivitu vůči CBR s ohledem na rozdílné časy a koncentrace. Stejně je tak tomu i u studie [116], která zkoumá inhibiční účinek v cytosolu izolovaném z lidských buněk, kde byly použity odlišné koncentrace a časy, ale i přesto je zde dospěno k stejnému závěru, a to čím vyšší koncentrace menadionu, tím je jeho inhibiční aktivita vůči CBR vyšší. Tuto myšlenku

také podporuje tato studie [117], která se zabývá stejně jako naše studie aktivitou a inhibicí biotransformačních enzymů FLU u vlasovky slezové, a to za využití kmenů ISE i IRE.

Inhibiční vlastnosti naringeninu se prokázaly nejen v této práci, ale také například ve studii [118], kde se zároveň potvrzují určité inhibiční schopnosti vůči lidským AKR u silybinu a luteolinu, kdy se inhibiční aktivita silybinu pohybuje okolo 50 % a luteolinu okolo se tyto hodnoty pohybují okolo 40 %, což se přibližuje výsledkům této práce. Hodnoty naringeninu se shodují dle této studie také, pohybují se okolo 70 %. Další prokázání inhibičních vlastností flavonoidů vůči CBR zaznamenala například studie [119, 120, 121, 122]. U studie [119, 120, 121] byly použity lidské enzymy a ve studii [122] byl inhibiční účinek zaznamenán v cytosolu izolovaném z myších buněk. Ve studii [121] byla zároveň detekována vyšší míra inhibiční aktivity kyseliny glycerhetinové v porovnání s výsledky v této práci.

Dalším inhibitorem, který vykazuje značnou inhibiční aktivitu vůči CBR je mebendazol, studovaný také ve studii [115]. V této studii byly použity vyšší koncentrace mebendazolu oproti našemu experimentu, v našem experimentu byl zaznamenán inhibiční účinek významnější než při vyšší koncentraci ve studii [120]. Ale právě mebendazol a jeho inhibiční aktivita vůči CBR by bylo vhodné podrobit dalším studiím, neboť se zdá, že závislost jeho inhibičních vlastností není přímo úměrná jeho koncentraci.

Ze všech studií patrné, že inhibiční aktivita má u každé skupiny inhibitorů odlišný způsob inhibice. Studium mechanismu působení inhibitorů na anthelmintika by bylo vhodné podrobněji zkoumat, neboť by tyto znalosti byly velmi přínosné v především v oblasti problematiky rezistence.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla věnována výzkumu inhibičních aktivit potenciálních inhibitorů enzymů redukujících flubendazol u vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) pomocí HPLC-MS. Konkrétně byly studovány inhibitory kyselina glycerhetinová, naringenin, silybin, luteolin, glyceraldehyd, menadion a mebendazol.

Výsledky lze shrnout následně:

- Tvorba redukované formy anthelmintika flubendazolu byla nejvíce inhibována menadionem.
- Značné míry inhibice cytosolových enzymů byl schopen naringenin, silybin a mebendazol.
- U luteolinu byla významnější inhibiční aktivita zaznamenána pouze v jedné koncentraci u jednoho kmene.
- Inhibiční aktivita nebyla detekována, nebo pouze v minimální míře, u kyseliny glycerhetinové a glyceraldehydu.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LANUSSE, C., C. CANTON, G. VIRKEL, L. ALVAREZ, L. COSTA-JUNIOR a A. LIFSCHITZ. Strategies to Optimize the Efficacy of Anthelmintic Drugs in Ruminants. *Trends in Parasitology*. 2018, **34**(8), 664-682. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2018.05.005
- [2] ROMERO-BENAVIDES, J. C., A. L. RUANO, R. SILVA-RIVAS, P. CASTILLO-VEINTIMILLA, S. VIVANCO-JARAMILLO a N. BAILON-MOSCOSO. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, **129**, 209-217. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2017.02.005
- [3] ABONGWA, M., R. J. MARTIN a A. P. ROBERTSON. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta Veterinaria*. 2017, **67**(2), 137-152. ISSN 1820-7448. Dostupné z: doi:10.1515/acve-2017-0013
- [4] JAYAWARDENE, K. L. T. D., E. A. PALOMBO a P. R. BOAG. Natural Products Are a Promising Source for Anthelmintic Drug Discovery. *Biomolecules*. 2021, **11**(10). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom11101457
- [5] CHARLIER, J., L. RINALDI, V. MUSELLA, et al. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*. 2020, **182**. ISSN 01675877. Dostupné z: doi:10.1016/j.prevetmed.2020.105103
- [6] FRENCH, K. E. Plant-Based Solutions to Global Livestock Anthelmintic Resistance. *Ethnobiology Letters*. 2018, **9**(2), 110-123. ISSN 2159-8126. Dostupné z: doi:10.14237/ebl.9.2.2018.980
- [7] AKHTAR, W., M. F. KHAN, Garima VERMA, M. SHAQUIQUZZAMAN, M.A. RIZVI, S. H. MEHDI, M. AKHTER a M. M. ALAM. Therapeutic evolution of benzimidazole derivatives in the last quinquennial period. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, **126**, 705-753. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2016.12.010
- [8] OLIVEIRA, E. A. M., G. F. FERREIRA a K. L. LANG. Drug repositioning of benzimidazole anthelmintics in the treatment of cryptosporidiosis: a review. *Medicinal Chemistry*

Research. 2022, **31**(1), 26-39. ISSN 1054-2523. Dostupné z: doi:10.1007/s00044-021-02824-4

[9] MAJEWSKY, M., D. CASTEL, L. LE DRET, P. JOHANN, D. T. JONES, S. M. PFISTER, W. E. HAEFELI a. BURHENNE. Systematic identification of suspected anthelmintic benzimidazole metabolites using LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, **151**, 151-158. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2017.12.056

[10] GEARY, T. G., Ch. D. MACKENZIE, S. A. SILBER a S. LUSTIGMAN. Flubendazole as a macrofilaricide: History and background. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019, **13**(1). ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0006436

[11] SON, D., E. LEE a S. E. ADUNYAH. The Antitumor Potentials of Benzimidazole Anthelmintics as Repurposing Drugs. *Immune Network*. 2020, **20**(4). ISSN 1598-2629. Dostupné z: doi:10.4110/in.2020.20.e29

[12] ESCALA, N., E. VALDERAS-GARCÍA, M. ÁLVAREZ BARDÓN, et al. Further and new target-based benzimidazole anthelmintics active against *Teladorsagia circumcincta*. *Journal of Molecular Structure*. 2022, **1269**. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2022.133735

[13] SPAGNUOLO, P. A., J. HU, R. HURREN, et al. The antihelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Blood*. 2010, **115**(23), 4824-4833. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-09-243055

[14] PubChem [online]. Bethesda (MD): Národní lékařská knihovna (USA), Národní centrum pro biotechnologické informace; 2004. PubChem Compound Summary pro CID 35802, Flubendazol; [cit.2023-03-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flubendazole>

[15] RUDOLF, K. a E. RUDOLF. An analysis of mitotic catastrophe induced cell responses in melanoma cells exposed to flubendazole. *Toxicology in Vitro*. 2020, **68**. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2020.104930

[16] ZHENG, M., J. HAN, J. MA, J. LIANG a H. ZHAO. Solubility and preferential solvation of flubendazole dissolved in aqueous co-solvent mixtures of 1,4-dioxane, dimethyl sulfoxide, N,N-dimethylformamide and isopropanol. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. 2019, **135**, 225-232. ISSN 00219614. Dostupné z: doi:10.1016/j.jct.2019.04.001

- [17] CHEN, Ch., Y. DING, H. LIU, M. SUN, H. WANG a D. WU. Flubendazole Plays an Important Anti-Tumor Role in Different Types of Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(1). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23010519
- [18] VIGH, T., B. DÉMUTH, A. BALOGH, et al. Oral bioavailability enhancement of flubendazole by developing nanofibrous solid dosage forms. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017, **43**(7), 1126-113. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.1080/03639045.2017.1298121
- [19] HÜBNER, M. P., A. EHRENS, M. KOSCHEL, et al. Macrofilaricidal efficacy of single and repeated oral and subcutaneous doses of flubendazole in *Litomosoides sigmodontis* infected jirds. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019, **13**(1). ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0006320
- [20] YUKUYAMA, M. N., K. ISHIDA, G. L. B. DE ARAUJO, et al. Rational design of oral flubendazole-loaded nanoemulsion for brain delivery in cryptococcosis. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021, **630**. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2021.127631
- [21] NIXON, G. L., L. MCENTEE, A. JOHNSON, et al. Repurposing and Reformulation of the Antiparasitic Agent Flubendazole for Treatment of Cryptococcal Meningoencephalitis, a Neglected Fungal Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018, **62**(4), e01909-17. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.01909-17
- [22] LIN, S., L. YANG, Y. YAO, et al. *Flubendazole demonstrates valid antitumor effects by inhibiting STAT3 and activating autophagy*. 2019, **38**(1). ISSN 1756-9966. Dostupné z: doi:10.1186/s13046-019-1303-z
- [23] KUBÍČEK, V., L. SKÁLOVÁ, A. SKARKA, V. KRÁLOVÁ, J. HOLUBOVÁ, J. ŠTĚPÁNKOVÁ, Z. ŠUBRT a B. SZOTÁKOVÁ. Carbonyl Reduction of Flubendazole in the Human Liver: Strict Stereospecificity, Sex Difference, Low Risk of Drug Interactions. *Frontiers in Pharmacology*. 2019, **10**. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2019.00600
- [24] MA, J., J. LIANG, J. HAN, M. ZHENG a H. ZHAO. *Solubility Modeling and Solvent Effect for Flubendazole in 12 Neat Solvents*. 2019, **64**(3), 1237-1243. ISSN 0021-9568. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jced.8b01126

- [25] ARAUJO L. B. G., FERREIRA F. F. a BERNARDES C. E. S., et al. A New Thermodynamically Favored Flubendazole/Maleic Acid Binary Crystal Form: Structure, Energetics, and in Silico PBPK Model-Based Investigation. *Crystal Growth and Design*. American Chemical Society, 2018, **18**(4), 2377–2386. Dostupné z: doi:10.1021/acs.cgd.7b01807
- [26] BECELAERE, J., E. VAN DEN BROECK, E. SCHOOLAERT, et al. Stable amorphous solid dispersion of flubendazole with high loading via electrospinning. *Journal of Controlled Release*. 2022, **351**, 123-136. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2022.09.028
- [27] SJOBERG, H. T., N. PIONNIER, G. ALJAYYOUSI, et al. Short-course, oral flubendazole does not mediate significant efficacy against *Onchocerca* adult male worms or *Brugia microfilariae* in murine infection models. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019, **13**(1). ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0006356
- [28] ELSE, K.J., J. KEISER, C. V. HOLLAND, et al. Whipworm and roundworm infections. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020, **6**(1). ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/s41572-020-0171-3
- [29] LI, Y., G. ACHARYA, M. ELAHI, H. XIN a L. M. KHACHIGIAN. The anthelmintic flubendazole blocks human melanoma growth and metastasis and suppresses programmed cell death protein-1 and myeloid-derived suppressor cell accumulation. *Cancer Letters*. 2019, **459**, 268-276. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2019.05.026
- [30] KHACHIGIAN, L. M. Emerging insights on functions of the anthelmintic flubendazole as a repurposed anticancer agent. *Cancer Letters*. 2021, **522**, 57-62. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2021.09.013
- [31] ČÁŇOVÁ, K., L. ROZKYDALOVÁ, D. VOKURKOVÁ a E. RUDOLF. Flubendazole induces mitotic catastrophe and apoptosis in melanoma cells. *Toxicology in Vitro*. 2018, **46**, 313-322. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2017.10.025
- [32] G, A. C., R. GONDRU, Y. LI a J. BANOTHU. Coumarin–benzimidazole hybrids: A review of developments in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2022, **227**. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2021.113921
- [33] KŘÍŽOVÁ, V., M. NOBILIS, L. PRUŠKOVÁ, J. CHLÁDEK, B. SZOTÁKOVÁ, V. CVILINK, L. SKÁLOVÁ a J. LAMKA. Pharmacokinetics of flubendazole and its metabolites

- in lambs and adult sheep (*Ovis aries*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2009, **32**(6), 606-612. ISSN 01407783. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2885.2009.01082.x
- [34] BÁRTÍKOVÁ, H., V. KRŽÍŽOVÁ, J. LAMKA, V. KUBÍČEK, L. SKÁLOVÁ a B. SZOTÁKOVÁ. Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with haemonchosis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2010, **33**(1), 56-62. ISSN 01407783. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2885.2009.01112.x
- [35] ČÁŇOVÁ, K., L. ROZKYDALOVÁ a E. RUDOLF. Anthelmintic Flubendazole and Its Potential Use in Anticancer Therapy. *Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)*. 2017, **60**(1), 5-11. ISSN 1211-4286. Dostupné z: doi:10.14712/18059694.2017.44
- [36] STUHLÍKOVÁ, L. R., P. MATOUŠKOVÁ, I. VOKŘÁL, et al. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2018, **8**(1), 50-58. ISSN 22113207. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpddr.2018.01.005
- [37] STUHLÍKOVÁ, L. R., P. MATOUŠKOVÁ, I. VOKŘÁL, et al. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2018, **8**(1), 50-58. ISSN 22113207. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpddr.2018.01.005
- [38] PUCKOWSKI, A., S. STOLTE, M. WAGIL, M. MARKIEWICZ, P. ŁUKASZEWICZ, P. STEPNOWSKI a A. BIAŁK-BIELIŃSKA. Mixture toxicity of flubendazole and fenbendazole to *Daphnia magna*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2017, **220**(3), 575-582. ISSN 14384639. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijheh.2017.01.011
- [39] CHEN, Ch., Y. DING, H. LIU, M. SUN, H. WANG a D. WU. Flubendazole Plays an Important Anti-Tumor Role in Different Types of Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(1). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23010519
- [40] SULTANA, T., J. LEE. Double Repositioning: Veterinary Antiparasitic to Human Anticancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(8). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23084315
- [41] JACOB, J., A. STEEL, Z. LIN, F. BERGER, K. ZÖELLER a S. JARVI. Clinical Efficacy and Safety of Albendazole and Other Benzimidazole Anthelmintics for Rat Lungworm Disease

(Neuroangiostrongyliasis): A Systematic Analysis of Clinical Reports and Animal Studies. *Clinical Infectious Diseases*. 2022, **74**(7), 1293-1302. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1093/cid/ciab730

[42] ABONGWA, M., R. J. MARTIN a A. P. ROBERTSON. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta Veterinaria*. 2017, **67**(2), 137-152. ISSN 1820-7448. Dostupné z: doi:10.1515/acve-2017-0013

[43] CHEN, Ch., Y. DING, H. LIU, M. SUN, H. WANG a D. WU. Flubendazole Plays an Important Anti-Tumor Role in Different Types of Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(1). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23010519

[44] SCARIM, C. B. a Ch. M. CHIN. The use of heterocyclic-based azo compounds bearing pyrrolidine, imidazole, triazole, and thiazole moieties for the treatment of neglected tropical disease caused by *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2021, **1**. ISSN 27724174. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmcr.2021.100001

[45] HU, Y., L. LIU, G. LIU, X. TU, G. WANG a F. LING. *Synthesis and anthelmintic activity of arctigenin derivatives against Dactylogyrus intermedius in goldfish*. 2017, **27**(15), 3310-3316. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2017.06.023

[46] GOESSENS, T., S. D. BAERE, N. D. TROYER, A. DEKNOCK, P. GOETHALS, L. LENS, F. PASMANS a S. CROUBELS. *Highly sensitive multi-residue analysis of veterinary drugs including coccidiostats and anthelmintics in pond water using UHPLC-MS/MS: application to freshwater ponds in Flanders, Belgium*. 2020, **22**(10), 2117-2131. ISSN 2050-7887. Dostupné z: doi:10.1039/D0EM00215A

[47] RAMOS, F., C. B. MARQUES, C. Z. REGINATO, P. BRÄUNIG, V. OSMARI, F. FERNANDES, L. A. SANGIONI a F. S. F. VOGEL. Field and Molecular Evaluation of Anthelmintic Resistance of Nematode Populations from Cattle and Sheep Naturally Infected Pastured on Mixed Grazing areas at Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Parasitologica*. 2020, **65**(1), 118-127. ISSN 1230-2821. Dostupné z: doi:10.2478/s11686-019-00137-6

[48] BRUNT, T. M., J. VAN DEN BERG, E. PENNINGES a B. VENHUIS. Adverse effects of levamisole in cocaine users: a review and risk assessment. *Archives of Toxicology*. 2017, **91**(6), 2303-2313. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-017-1947-4

[49] JUNCO, M., L. E. IGLESIAS, M. F. SAGUÉS, I. GUERRERO, S. ZEGBI a C. A. SAUMELL. Effect of macrocyclic lactones on nontarget coprophilic organisms: a

review. *Parasitology Research*. 2021, **120**(3), 773-783. ISSN 0932-0113. Dostupné z: doi:10.1007/s00436-021-07064-4

[50] MARTIN, R. J., A. P. ROBERTSON a S. CHOUDHARY. Ivermectin: An Anthelmintic, an Insecticide, and Much More. *Trends in Parasitology*. 2021, **37**(1), 48-64. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2020.10.005

[51] BAZZANO, M., A. DI SALVO, M. DIAFERIA, et al. Anthelmintic Efficacy and Pharmacokinetics of Ivermectin Paste after Oral Administration in Mules Infected by Cyathostomins. *Animals*. 2020, **10**(6). ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani10060934

[52] YAN, Y. a H. XIA. Recent advances in the research of milbemycin biosynthesis and regulation as well as strategies for strain improvement. *Archives of Microbiology*. 2021, **203**(10), 5849-5857. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-021-02575-1

[53] BARTLEY, D. J., K. HAMER, L. ANDREWS, N. D. SARGISON a A. A. MORRISON. Multigenic resistance to monepantel on a UK sheep farm. *Veterinary Parasitology*. 2019, **276**. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vpoa.2019.100003

[54] DE ALBUQUERQUE, A. C. A., C. C. BASSETTO, F. A. DE ALMEIDA a A.F.T. AMARANTE. Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. *Veterinary Parasitology*. 2017, **246**, 112-117. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2017.09.010

[55] SKÁLOVÁ, L.. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 2017. ISBN 978-80-246-3733-4.

[56] HOLLMANN, F., D. J. OPPERMAN a C. E. PAUL. Biocatalytic Reduction Reactions from a Chemist's Perspective. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021, **60**(11), 5644-5665. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.202001876

[57] PENNING, T. M. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*. 2015, **234**, 236-246. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2014.09.024

[58] BECK, K. R., T. KASERER, D. SCHUSTER a A. ODERMATT. Virtual screening applications in short-chain dehydrogenase/reductase research. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017, **171**, 157-177. ISSN 09600760. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsbmb.2017.03.008

- [59] PORTÉ, S., F. XAVIER RUIZ, J. GIMÉNEZ, et al. Aldo–keto reductases in retinoid metabolism: Search for substrate specificity and inhibitor selectivity. *Chemico-Biological Interactions*. 2013, **202**(1-3), 186-194. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2012.11.014
- [60] PISKA, K., P. KOCZURKIEWICZ, A. BUCKI, K. WÓJCIK-PSZCZOŁA, M. KOŁACZKOWSKI a E. PEKALA. Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines — role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Investigational New Drugs*. 2017, **35**(3), 375-385. ISSN 0167-6997. Dostupné z: doi:10.1007/s10637-017-0443-2
- [61] WESTERMANN, M., A. G. ADOMAKO-BONSU, S. THIELE, S. S. ÇIÇEK, H. MARTIN a E. MASER. Inhibition of human carbonyl reducing enzymes by plant anthrone and anthraquinone derivatives. *Chemico-Biological Interactions*. 2022, **354**. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2022.109823
- [62] KUBÍČEK, V., L. SKÁLOVÁ, A. SKARKA, V. KRÁLOVÁ, J. HOLUBOVÁ, J. ŠTĚPÁNKOVÁ, Z. ŠUBRT a B. SZOTÁKOVÁ. Carbonyl Reduction of Flubendazole in the Human Liver: Strict Stereospecificity, Sex Difference, Low Risk of Drug Interactions. *Frontiers in Pharmacology*. 2019, **10**. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2019.00600
- [63] JIA, H., F. JIA, B. ZHU a W. ZHANG. Preparation and characterization of glycyrrhetic acid loaded PEG-modified liposome based on PEG-7 glyceryl cocoate. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2017, **119**(7). ISSN 1438-7697. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.201600010
- [64] RIZZATO, G., E. SCALABRIN, M. RADAELLI, G. CAPODAGLIO a O. PICCOLO. A new exploration of licorice metabolome. *Food Chemistry*. 2017, **221**, 959-968. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.068
- [65] KOWALSKA, A. a U. KALINOWSKA-LIS. 18 β -Glycyrrhetic acid: its core biological properties and dermatological applications. *International Journal of Cosmetic Science*. 2019. ISSN 0142-5463. Dostupné z: doi:10.1111/ics.12548
- [66] SALEHI, B., P. FOKOU, M. SHARIFI-RAD, P. ZUCCA, R. PEZZANI, N. MARTINS a J. SHARIFI-RAD. The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals*. 2019, 12(1). ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph12010011

- [67] JEANDET, P., E. SOBARZO-SÁNCHEZ, Ch. CLÉMENT, S. NABAVI, S. HABTEMARIAM, S. M. NABAVI a S. CORDELIER. Engineering stilbene metabolic pathways in microbial cells. *Biotechnology Advances*. 2018, **36**(8), 2264-223. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.002
- [68] PubChem [online]. Bethesda (MD): Národní lékařská knihovna (USA), Národní centrum pro biotechnologické informace; 2004-. PubChem Compound Summary pro CID 439246, Naringenin; [cit. 2023-02-25]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naringenin>
- [69] WANG, Q., J. YANG, X. ZHANG, L. ZHOU, X. LIAO a B. YANG. Practical Synthesis of Naringenin. *Journal of Chemical Research*. 2015, **39**(8), 455-457. ISSN 1747-5198. Dostupné z: doi:10.3184/174751915X14379994045537
- [70] PubChem [online]. Bethesda (MD): Národní lékařská knihovna (USA), Národní centrum pro biotechnologické informace; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 31553, Silibinin; [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silibinin>
- [71] TAKKE, A. a P. SHENDE. Nanotherapeutic silibinin: An insight of phytomedicine in healthcare reformation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019, **21**. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2019.102057
- [72] BIJAK, M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*. 2017, **22**(11). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22111942
- [73] BIJAK, M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*. 2017, **22**(11). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22111942
- [74] IMRAN, M. A. RAUF, T. ABU-IZNEID, et al. *Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review*. 2019, **11**. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2019.108612
- [75] PubChem [online]. Bethesda (MD): Národní lékařská knihovna (USA), Národní centrum pro biotechnologické informace; 2004-. PubChem Compound Summary pro CID 5280445, Luteolin; [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Luteolin>

- [76] PubChem [online]. Bethesda (MD): Národní lékařská knihovna (USA), Národní centrum pro biotechnologické informace; 2004-. PubChem Compound Summary pro CID 751, Glycerinaldehyd; [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycerinaldehyde>
- [77] MAGI, S., A. PREZIUSO, S. PICCIRILLO, F. GIAMPIERI, D. CIANCIOSI, M. ORCIANI a S. AMOROSO. The Neuroprotective Effect of L-Carnitine against Glycerinaldehyde-Induced Metabolic Impairment: Possible Implications in Alzheimer's Disease. *Cells*. 2021, **10**(8). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10082109
- [78] KORIYAMA, Y., A. FURUKAWA, M. MURAMATSU, J. TAKINO M. TAKEUCHI. Glycerinaldehyde caused Alzheimer's disease-like alterations in diagnostic marker levels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Scientific Reports*. 2015, **5**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep13313
- [79] PubChem [online]. Bethesda (MD): Národní lékařská knihovna (USA), Národní centrum pro biotechnologické informace; 2004-. PubChem Compound Summary pro CID 4055, Menadione; [cit. 2023-03-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menadione>
- [80] DE SOUZA, A. S, R. C. B RIBEIRO, D. C S COSTA, et al. Menadione: a platform and a target to valuable compounds synthesis. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2022, **18**, 381-419. ISSN 1860-5397. Dostupné z: doi:10.3762/bjoc.18.43
- [81] PubChem [online]. Bethesda (MD): Národní lékařská knihovna (USA), Národní centrum pro biotechnologické informace; 2004-. PubChem Compound Summary pro CID 4030, Mebendazol; [cit. 2023-02-21]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mebendazole>
- [82] AL-KARMALAWY, A. A. a M. KHATTAB. Molecular modelling of mebendazole polymorphs as a potential colchicine binding site inhibitor. *New Journal of Chemistry*. 2020, **44**(33), 13990-13999. ISSN 1144-0546. Dostupné z: doi:10.1039/D0NJ02844D
- [83] NICIURA, S. C. M., P. C. TIZIOTO, C. V. MORAES, et al. *Extreme-QTL mapping of monepantel resistance in Haemonchus contortus*. 2019, **12**(1). ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-019-3663-9
- [84] EHSAN, M., R. HU, Q. LIANG, J. HOU, X. SONG, R. YAN, X. ZHU a X. LI. Advances in the Development of Anti-Haemonchus contortus Vaccines: Challenges, Opportunities, and

Perspectives. *Vaccines*. 2020, **8**(3). ISSN 2076-393X. Dostupné z: doi:10.3390/vaccines8030555

[85] ARSENOPOULOS, K. V., G. C. FTHENAKIS, E. I. KATSAROU a E. PAPADOPOULOS. Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. *Animals*. 2021, **11**(2). ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani11020363

[86] FLAY, K. J., F. I. HILL a D. H. MUGUIRO. A Review: Haemonchus contortus Infection in Pasture-Based Sheep Production Systems, with a Focus on the Pathogenesis of Anaemia and Changes in Haematological Parameters. *Animals*. 2022, **12**(10). ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani12101238

[87] ADDUCI, I., F. SAJOVITZ, B. HINNEY, K. LICHTMANNSPERGER, A. JOACHIM, T. WITTEK a S. YAN. Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against Haemonchus contortus. *Animals*. 2022, **12**(18). ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani12182339

[88] ENGSTRÖM, M. [online] (2016). Understanding the bioactivity of plant tannins: developments in analysis methods and structure-activity studies. [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/305392021_Understanding_the_bioactivity_of_plant_tannins_developments_in_analysis_methods_and_structure-activity_studies

[89] *Barbervax* [online]. Moredun: Moredun Foundation, 2023 [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://barbervax.com/>

[90] BESIER, R.B., L.P. KAHN, N.D. SARGISON a J.A. VAN WYK. Diagnosis, Treatment and Management of Haemonchus contortus in Small Ruminants. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Elsevier, 2016, 2016, 181-238. Advances in Parasitology. ISBN 9780128103951. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apar.2016.02.024

[91] BESIER, R.B., L.P. KAHN, N.D. SARGISON a J.A. VAN WYK. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of Haemonchus contortus Infection in Small Ruminants. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Elsevier, 2016, 2016, 95-143. Advances in Parasitology. ISBN 9780128103951. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apar.2016.02.022

[92] WIDIARSO, B. P., K. KURNIASIH, J. PRASTOWO a W. NURCAHYO. Morphology and morphometry of Haemonchus contortus exposed to Gigantochloa apus crude aqueous

extract. *Veterinary World*. 18, **11**(7), 921-925. ISSN 09728988. Dostupné z: doi:10.14202/vetworld.2018.921-925

[93] MA, J., J. SHI, H. LE, R. CHO, J. Ch. HUANG, S. MIAO a B. K. WONG. A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC–MS/MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B*. 2008, **862**(1-2), 219-226. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2007.12.012

[94] KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0586-2.

[95] NOVÁK, P. a V. HAVLÍČEK. Protein Extraction and Precipitation. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*. Elsevier, 2016, 2016, 51-62. ISBN 9780444636881. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63688-1.00004-5

[96] NAHAR, L., A. ONDER a S. D. SARKER. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). *Phytochemical Analysis*. 2020, **31**(4), 413-457. ISSN 0958-0344. Dostupné z: doi:10.1002/pca.2906

[97] ŽUVELA, P., M. SKOCZYLAS, J. JAY LIU, T. BĄCZEK, R. KALISZAN, M. W. WONG a B. BUSZEWSKI. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews*. 2019, **119**(6), 3674-3729. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00246

[98] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha, Hradec Králové, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

[99] CIBIČEK, N. a J. VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.

[100] Shimadzu Corporation. *Shimadzu* [online]. Japonsko: Shimadzu Corporation, 2022 [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html

[101] DAVID, V., S. C. MOLDOVEANU a T. GALAON. Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biomedical Chromatography*. 2021, **35**(1). ISSN 0269-3879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.5008

- [102] BUCHBERGER, A. R., K. DELANEY, J. JOHNSON a L. LI. Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Analytical Chemistry*. 2017, **90**(1), 240-265. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b04733
- [103] KŘÍŽEK, M. a J. ŠÍMA. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015. ISBN 978-80-7394-486-5.
- [104] FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. Laboratoř dědičných metabolických poruch, OKB, Fakultní nemocnice Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 2012, **20 (41)**(3), 152–157.
- [105] FAKTOR, J., DVOŘÁKOVÁ, M., MARYAS, J., PROCHÁZKOVÁ, I., BOUCHAL, P. (2012). Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies. *Klinická onkologie: Časopis České a Slovenské onkologické společnosti*. 25 Suppl 2. 2S70-7.
- [106] SEGER, Ch. a L. SALZMANN. After another decade: LC–MS/MS became routine in clinical diagnostics. *Clinical Biochemistry*. 2020, **82**, 2-11. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.03.004
- [107] SRIVIDYA K.. LC-MS – What Is LC-MS, LC-MS Analysis and LC-MS/MS. *Technology Networks: Analysis and Separations* [online]. Technology Networks: Analysis and Separations, 2021, May 9, 2022 [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238>
- [108] HERRICKS, J. R., P. J. HOTEZ, V. WANGA, et al. The global burden of disease study 2013: What does it mean for the NTDs?. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017, **11**(8). ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0005424
- [109] CHARLIER, J., L. RINALDI, V. MUSELLA, et al. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*. 2020, **182**. ISSN 01675877. Dostupné z: doi:10.1016/j.prevetmed.2020.105103
- [110] ŠTĚPÁNKOVÁ, J. *CHARAKTERIZACE REDUKCE FLUBENDAZOLU U ČLOVĚKA IN VITRO*. Hradec Králové, 2018. Rigorózní práce. UNIVERZITA KARLOVA FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ, Katedra biochemických věd.

- [111] ROSEMOND, M. Jane Cox a John S. WALSH. Human Carbonyl Reduction Pathways and a Strategy for Their Study In Vitro. *Drug Metabolism Reviews*. 2004, **36**(2), 335-361. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.1081/DMR-120034154
- [112] STUHLÍKOVÁ, L. R., P. MATOUŠKOVÁ, I. VOKŘÁL, et al. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2018, **8**(1), 50-58. ISSN 22113207. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpddr.2018.01.005
- [113] ZEMANOVÁ, L. *Význam enzymů z nadrodin AKR a SDR u člověka*. Hradec Králové, 2018. Habilitační práce. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [114] RAMSDEN, D., D. SMITH, R. ARENAS, K. FREDERICK a M. A. CERNY. Identification and Characterization of a Selective Human Carbonyl Reductase 1 Substrate. *Drug Metabolism and Disposition*. 2018, **46**(10), 1434-1440. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.118.082487
- [115] MATÉ, L., G. VIRKEL, A. LIFSCHITZ, M. BALLENT a C. LANUSSE. Hepatic and extra-hepatic metabolic pathways involved in flubendazole biotransformation in sheep. *Biochemical Pharmacology*. 2008, **76**(6), 773-783. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2008.07.002
- [116] BERHE, S., A. SLUPE, Ch. LUSTER, et al. *Synthesis of 3-[(N-carboalkoxy)ethylamino]-indazole-dione derivatives and their biological activities on human liver carbonyl reductase*. 2010, **18**(1), 134-141. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2009.11.011
- [117] VOKŘÁL, I., H. BÁRTÍKOVÁ, L. PRCHAL, et al. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*. 2012, **139**(10), 1309-1316. ISSN 0031-1820. Dostupné z: doi:10.1017/S0031182012000595
- [118] ŠKARYDOVÁ, L., L. ŽIVNÁ, G. XIONG, E. MASER a V. WSÓL. AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. *Chemico-Biological Interactions*. 2009, **178**(1-3), 138-144. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2008.10.015

- [119] CARLQUIST, M., T. FREJD a M. F. GORWA-GRAUSLUND. Flavonoids as inhibitors of human carbonyl reductase 1. *Chemico-Biological Interactions*. 2008, **174**(2), 98-108. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2008.05.021
- [120] MÖLLER, G., V. TEMML, A. CALA PERALTA, et al. Analogues of Natural Chalcones as Efficient Inhibitors of AKR1C3. *Metabolites*. 2022, **12**(2). ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo12020099
- [121] ENDO, S., N. MIYAGI, T. MATSUNAGA, A. HARA a A. IKARI. Human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 11 is a novel type of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016, **472**(1), 231-236. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.190
- [122] SHIMADA, Hideaki, Kazumi MIURA a Yorishige IMAMURA. Characteristics and inhibition by flavonoids of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in mouse tissues. *Life Sciences*. 2006, **78**(25), 2931-2936. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2005.11.022